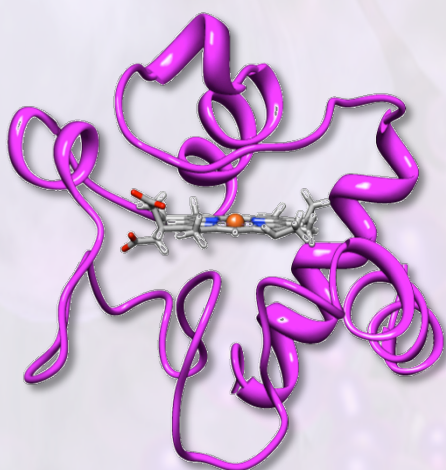
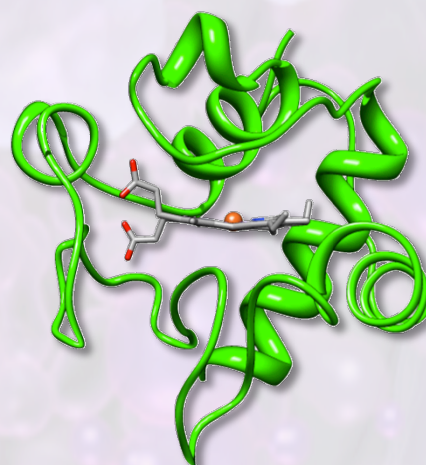


TESIS DOCTORAL

**Desvelando el Curso Evolutivo de la Red de  
Proteínas que Interaccionan con el  
Citocromo c en la Muerte Celular Programada**



*Homo sapiens*



*Arabidopsis thaliana*

JONATHAN MARTÍNEZ FÁBREGAS



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN







INSTITUTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS  
Universidad de Sevilla  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



**DESVELANDO EL CURSO EVOLUTIVO DE LA RED DE PROTEÍNAS QUE  
INTERACCIONAN CON EL CITOCROMO *c* EN LA  
MUERTE CELULAR PROGRAMADA**

**Memoria presentada por el licenciado Jonathan Martínez Fábregas para  
optar al grado de Doctor en Biología**

SEVILLA, 2011

Co-Directores

Miguel Ángel de la Rosa Acosta  
Catedrático de Universidad

José Antonio Navarro Carruesco  
Científico Titular del CSIC







## ÍNDICE

*“El orden es el placer de la razón,  
pero el desorden es la delicia de la imaginación”  
(Paul Claudel)*





<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>17</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>27</b>
<b>ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>35</b>
1.1. Muerte Celular: Algo de Historia	37
1.2. Muerte Celular en Mamíferos	39
1.2.1. Apoptosis	41
1.2.2. Autofagia	42
1.2.3. Necrosis	42
1.3. La apoptosis: Un Proceso Estrechamente Controlado	43
1.3.1. Morfología de la Apoptosis	44
1.3.2. Apoptosis <i>versus</i> Necrosis	47
1.3.3. Rutas Apoptóticas	49
1.3.3.1. Características Bioquímicas	51
1.3.3.2. Ruta Extrínseca	53
1.3.3.3. Ruta Perforina/Granzima	55
1.3.3.4. Ruta Intrínseca	57
1.3.4. Ruta de Ejecución	62
1.4. Apoptosis en Condiciones Fisiológicas	63
1.5. Apoptosis en Condiciones Patológicas	64

1.6. Citocromo c: Una Proteína Bifuncional	67
1.7. PCD en otros Organismos. Una Mirada Evolutiva	72
1.7.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	72
1.7.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	75
1.7.3. Plantas Superiores	77
1.7.3.1. Liberación de Citocromo c	78
1.7.3.2. Liberación de Endonucleasas	79
1.7.3.3. Papel de la Mitocondria en la PCD	
Vegetal	79
1.8. Objetivos de la Tesis Doctoral	81
 2. MATERIALES Y MÉTODOS	 85
2.1. Organismos y Condiciones de Cultivo	87
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	87
2.1.2. Células de <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
2.1.3. Células de <i>Homo sapiens</i>	90
2.1.4. Métodos para la Recolección de Células	92
2.2. Métodos de Biología Molecular	92
2.2.1. Aislamiento de ADN Plasmídico	92
2.2.2. Transformación de Células de <i>Escherichia coli</i>	93
2.2.3. Diseño de Oligonucleótidos	94
2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa	95
2.2.5. Clonación de los Productos de PCR	96
2.2.6. Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa	97

<b>2.2.7. Secuenciación de ADN</b>	<b>98</b>
<b>2.3. Obtención de los Mutantes de Citocromo c</b>	<b>98</b>
<b>2.3.1. Obtención de los Mutantes A111C y E104C</b>	<b>98</b>
<b>2.3.2. Expresión y Purificación de los Mutantes A111C y E104C</b>	<b>99</b>
<b>2.4. Métodos de Estudio de Apoptosis en Células <i>Jurkat</i></b>	<b>101</b>
<b>2.4.1. Inducción de Apoptosis</b>	<b>101</b>
<b>2.4.2. Determinación de Apoptosis Mediante Tinción con DAPI</b>	<b>101</b>
<b>2.4.3. Determinación de Apoptosis Mediante Citometría de Flujo</b>	<b>102</b>
<b>2.4.4. Ensayo de Fragmentación de ADN</b>	<b>102</b>
<b>2.4.5. Ensayo de Viabilidad Celular</b>	<b>103</b>
<b>2.5. Métodos de Estudio de PCD en Células de <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>103</b>
<b>2.5.1. Inducción de PCD</b>	<b>103</b>
<b>2.5.2. Medida de Viabilidad Celular</b>	<b>104</b>
<b>2.5.3. Seguimiento de los Cambios Morfológicos</b>	<b>104</b>
<b>2.5.4. Determinación de la Concentración de Proteína y Clorofila</b>	<b>104</b>
<b>2.6. Preparación de Extractos para Cromatografía de Afinidad</b>	<b>105</b>
<b>2.6.1. Células <i>Jurkat</i></b>	<b>105</b>
<b>2.6.2. Células MM2d de <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>106</b>

<b>2.7. Cromatografía de Afinidad: Identificación de Nuevas</b>	
<b>Dianas del Citocromo c</b>	<b>106</b>
<b>2.7.1. Montaje de las Columnas para la Cromatografía</b>	
<b>de Afinidad</b>	<b>106</b>
<b>2.7.2. Purificación de Nuevas Dianas del Citocromo c</b>	<b>107</b>
<b>2.8. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c</b>	<b>108</b>
<b>2.8.1. 2D SDS-PAGE. Muestras Procedentes de Células</b>	
<b><i>Jurkat</i></b>	<b>108</b>
<b>2.8.2. Preparación de las Muestras de Proteínas de</b>	
<b>Células <i>Jurkat</i> para Espectrometría de Masas</b>	<b>109</b>
<b>2.8.3. Identificación de las Dianas del Citocromo c en</b>	
<b>Células <i>Jurkat</i> Mediante MALDI-TOF/MS</b>	<b>110</b>
<b>2.8.4. Análisis Bioinformático de los Datos de MALDI-</b>	
<b>TOF/MS</b>	<b>110</b>
<b>2.8.5. Identificación de las Dianas del Citocromo c en</b>	
<b>Células de <i>Arabidopsis thaliana</i> Mediante NanoLC-</b>	
<b>MS/MS</b>	<b>111</b>
<b>2.8.6. Análisis Bioinformático de los Datos de nanoLC-</b>	
<b>MS/MS</b>	<b>112</b>
<b>2.9. Estudio <i>in vivo</i> de la Interacción entre el Citocromo c y</b>	
<b>sus Dianas: Complementación Bimolecular de la</b>	
<b>Fluorescencia, BiFC</b>	<b>112</b>



2.9.1. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo c Humano en Células HEK293T	112
2.9.2. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo c de <i>Arabidopsis thaliana</i> en Protoplastos	115
2.9.3. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo c de <i>Arabidopsis thaliana</i> en Células HEK293T	116
2.9.4. Ensayo de BiFC en Células HEK293T	118
2.9.5. Ensayo de BiFC en Células MM2d	119
2.10. Análisis de la Expresión de las Construcciones de BiFC Mediante Western Blot	120
2.11. Análisis <i>in silico</i> de la Interacciones del Citocromo c Mediante DOCKING Molecular	121
2.12. Diseño Racional de Mutantes de Citocromo c Humano	122
2.13. Efecto de la Sobreexpresión del Citocromo c Bajo la Sobreexpresión de PVALB o NPM	123
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>125</b>
3.1. Obtención de las Variantes E104C y A111C	127
3.1.1. Mutagénesis Dirigida	127
3.1.2. Expresión y Purificación de las Variantes E104C y A111C	128

<b>3.2. Búsqueda de Nuevas Dianas del Citocromo c en la Apoptosis de Mamíferos</b>	<b>129</b>
<b>3.2.1. Inducción de Apoptosis en Células <i>Jurkat</i> Mediante CPT</b>	<b>129</b>
<b>3.2.2. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c: Una Aproximación Proteómica</b>	<b>133</b>
<b>3.2.2.1. Cromatografía de Afinidad</b>	<b>133</b>
<b>3.2.2.2. Electroforesis 2D SDS-PAGE</b>	<b>136</b>
<b>3.2.3. Verificación <i>in vivo</i> de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas Mediante BiFC</b>	<b>139</b>
<b>3.2.3.1. Generalidades</b>	<b>139</b>
<b>3.2.3.2. Obtención de las Proteínas de Fusión</b>	<b>140</b>
<b>3.2.3.3. Localización Subcelular del Citocromo c</b>	<b>141</b>
<b>3.2.3.4. Análisis <i>in vivo</i> de las Interacciones</b>	<b>143</b>
<b>3.2.4. Análisis <i>in silico</i> de los Complejos Formados entre el Citocromo c y sus Nuevas Dianas</b>	<b>148</b>
<b>3.2.4.1. Generalidades</b>	<b>148</b>
<b>3.2.4.2. Complejo Citocromo c - ALDOA</b>	<b>149</b>
<b>3.2.4.3. Complejo Citocromo c - ANP32B</b>	<b>151</b>
<b>3.2.4.4. Complejo Citocromo c - PVALB</b>	<b>153</b>
<b>3.2.4.5. Complejo Citocromo c - YWHAЕ</b>	<b>157</b>
<b>3.2.5. Efecto de las Mutaciones en la Zona de Interacción del Citocromo c</b>	<b>158</b>

3.2.5.1. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - PVALB	160
3.2.5.2. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - ANP32B	161
3.2.5.3. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - ALDOA	162
3.2.5.4. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - YWHAЕ	163
3.2.6. Inhibición del Efecto Anti-apoptótico de PVALB o NPM	164
3.3. Papel del Citocromo c en la PCD de Plantas	170
3.3.1. Inducción de PCD en Células de <i>Arabidopsis thaliana</i> y Preparación de Extractos Totales	170
3.3.2. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c de <i>Arabidopsis thaliana</i>	175
3.3.2.1. Cromatografía de Afinidad	175
3.3.2.2. NanoLC-MS/MS	176
3.3.3. Verificación de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas en Protoplastos Mediante BiFC	179
3.3.4. Verificación de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas en Células HEK293T Mediante BiFC	180
3.4. Citocromo c: Una Proteína Estructuralmente Conservada a lo Largo de la Evolución	186

<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>191</b>
<b>4.1. Papel del Citocromo c en la Apoptosis de Mamíferos</b>	<b>193</b>
4.1.1. Introducción	193
4.1.2. Red de Interacciones del Citocromo c Durante la Apoptosis	194
4.1.2.1. Dianas Implicadas en la Reparación del ADN	197
4.1.2.1.1. SET	197
4.1.2.1.2. NPM y hnRNP C1/C2	197
4.1.2.2. Rutas de Supervivencia Celular	198
4.1.2.2.1. PROX1	198
4.1.2.2.2. YWHAЕ	198
4.1.2.2.3. STRAP	199
4.1.2.2.4. HSPA5	199
4.1.2.2.5. NCL	200
4.1.2.3. Rutas Metabólicas Bloqueadas Durante la Apoptosis	200
4.1.2.3.1. eIF2 $\alpha$	200
4.1.2.3.2. MCM6	200
4.1.2.4. Inhibición de las Caspasas	201
4.1.2.4.1. ANP32B	201
4.1.2.4.2. ALDOA	201
4.1.2.4.3. HSPA5	202
4.1.2.5. Inhibición de Rutas Apoptóticas	202
4.1.2.5.1. YWHAЕ y STRAP	202

4.1.2.5.2. SET	203
4.1.2.5.3. NPM	203
4.1.2.5.4. NCL	204
4.1.2.5.5. PVALB	204
4.1.3. El Citocromo c. Regulador Maestro de la Apoptosis	204
4.1.4. Apoptosis en Mamíferos. Una Compleja Red de Interacciones del Citocromo c	207
4.1.5. Implicaciones Evolutivas de Esta Red de Interacciones	209
4.2. Papel del Citocromo c en la PCD Vegetal	210
4.2.1. Introducción	210
4.2.2. Red de Interacciones del Citocromo c Durante la PCD Vegetal	212
4.2.2.1. BiP1 y BiP2	214
4.2.2.2. NRP1	214
4.2.2.3. eIF2 $\gamma$	215
4.2.2.4. RD21	215
4.2.2.5. GLY2	216
4.2.2.6. Sm/D1	217
4.2.2.7. TCL	218
4.2.2.8. GAPDC1	218
4.2.3. Significado Fisiológico de las Interacciones del Citocromo c Durante la PCD Vegetal	219



**5. CONCLUSIONES** **222**

**6. BIBLIOGRAFÍA** **228**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Apoptosis en condiciones fisiológicas.	<b>39</b>
<b>Figura 2.</b> Apoptosis en condiciones patológicas.	<b>40</b>
<b>Figura 3.</b> Principales rutas de muerte celular.	<b>41</b>
<b>Figura 4.</b> Cambios morfológicos que caracterizan a la apoptosis.	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b> Visualización de células apoptóticas mediante microscopía visible.	<b>46</b>
<b>Figura 6.</b> Visualización de células apoptóticas mediante microscopía electrónica.	<b>47</b>
<b>Figura 7.</b> Apoptosis <i>versus</i> Necrosis.	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Principales rutas de control de la apoptosis en mamíferos.	<b>50</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema de la organización en dominios de las caspasas humanas.	<b>52</b>
<b>Figura 10.</b> Ruta extrínseca de la apoptosis.	<b>54</b>
<b>Figura 11.</b> Ruta Perforina/Granzima de la apoptosis.	<b>56</b>
<b>Figura 12.</b> Ruta intrínseca de la apoptosis.	<b>59</b>
<b>Figura 13.</b> Organización de los dominios de los miembros de la familia Bcl-2.	<b>60</b>
<b>Figura 14.</b> Alineamiento de las secuencias de Cc respiratorio de diferentes organismos.	<b>68</b>
<b>Figura 15.</b> Comparación estructural del Cc.	<b>68</b>
<b>Figura 16.</b> Doble papel del Cc en mamíferos.	<b>69</b>

<b>Figura 17.</b> Comparación de la ruta de señalización apoptótica en <i>C.elegans</i> y mamíferos.	<b>73</b>
<b>Figura 18.</b> Comparación de la ruta de activación del apoptosoma CED-4 ( <i>C. elegans</i> ) y APAF1 ( <i>H. sapiens</i> ).	<b>74</b>
<b>Figura 19.</b> Comparación de la ruta de activación del apoptosoma DARK ( <i>D. melanogaster</i> ) y APAF1 ( <i>H. sapiens</i> ).	<b>76</b>
<b>Figura 20.</b> Modelo de la ruta de señalización de PCD en plantas.	<b>80</b>
<b>Figura 21.</b> Esquema del funcionamiento del BiFC.	<b>82</b>
<b>Figura 22.</b> Cultivos de células MM2d de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>88</b>
<b>Figura 23.</b> Cultivo de células <i>Jurkat</i> .	<b>91</b>
<b>Figura 24.</b> Cultivo de células HEK293T.	<b>91</b>
<b>Figura 25.</b> Cultivos de células HEK293T para experimentos de microscopía.	<b>92</b>
<b>Figura 26.</b> Secuencia de los mutantes de Cc A111C y E104C.	<b>99</b>
<b>Figura 27.</b> Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en células HEK293T, usando los vectores <i>pCYFP</i> (Cc de <i>H. sapiens</i> ) o <i>pNYFP</i> (dianas del Cc).	<b>114</b>
<b>Figura 28.</b> Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en protoplastos de <i>A. thaliana</i> , usando los vectores <i>pSPYCE</i> (Cc de <i>A. thaliana</i> ) o <i>pSPYNE</i> (dianas del Cc).	<b>116</b>
<b>Figura 29.</b> Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en células HEK293T, usando los vectores <i>pCYFP</i> (Cc de <i>A. thaliana</i> ) o <i>pNYFP</i> (dianas del Cc).	<b>118</b>

<b>Figura 30.</b> Secuenciación de las variantes E104C y A111C del Cc.	<b>127</b>
<b>Figura 31.</b> Purificación de Cc mediante cromatografía de intercambio iónico en columna de carboximetil-celulosa.	<b>128</b>
<b>Figura 32.</b> Espectro de absorción UV-Visible del Cc.	<b>129</b>
<b>Figura 33.</b> Escalera de ADN en células <i>Jurkat</i> tratadas con CPT 10 $\mu$ M durante 0, 6, 10 y 24 horas.	<b>130</b>
<b>Figura 34.</b> Tinción con DAPI de células <i>Jurkat</i> tratadas o no tratadas con CPT 10 $\mu$ M.	<b>131</b>
<b>Figura 35.</b> Determinación del porcentaje de apoptosis en células <i>Jurkat</i> tratadas con CPT 10 $\mu$ M durante 0, 3, 6, 10 y 24 horas mediante citometría de flujo.	<b>131</b>
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de células <i>Jurkat</i> en apoptosis tras el tratamiento con CPT 10 $\mu$ M durante 0, 3, 6, 10 y 24 horas, determinado mediante citometría de flujo (barras negras) y azul Trypan (barras grises).	<b>132</b>
<b>Figura 37.</b> Columnas de tiol-sefarosa 4B usadas para la cromatografía de afinidad.	<b>134</b>
<b>Figura 38.</b> Identificación de nuevas dianas del Cc de <i>H. sapiens</i> .	<b>135</b>
<b>Figura 39.</b> Imagen del “master gel” en la que se indican las proteínas que interaccionan con el Cc en condiciones apoptóticas, o tanto en condiciones apoptóticas como homeostáticas.	<b>137</b>

- Figura 40.** Control positivo (*pBiFC-bFosYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) y control negativo (*pBiFC-bFosΔZIPYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) empleados en los experimentos de BiFC. 140
- Figura 41.** Localización mitocondrial del Cc en condiciones homeostáticas observada mediante BiFC. 142
- Figura 42.** Localización citoplásmica del Cc en condiciones apoptóticas observada mediante BiFC. 143
- Figura 43.** Expresión de Cc-CYFP determinada mediante Western blot. 143
- Figura 44.** Localización citoplásmica de las interacciones establecidas entre el Cc y eIF2 $\alpha$ , YWHAЕ o MCM6 analizadas por BiFC. 144
- Figura 45.** Localización nuclear de las interacciones establecidas entre el Cc y hnRNP C1/C2, PROX1 o SET analizadas por BiFC. 145
- Figura 46.** Localización núcleo-citoplásmica de los complejos entre Cc y PVALB, ANP32B, NCL, NPM, STRAP o HSPA5 analizadas por BiFC. 146
- Figura 47.** Localización mitocondrial (0 horas) o citoplásmica (6 horas) de la interacción entre el Cc y ALDOA determinada por BiFC. 147
- Figura 48.** Control negativo de la interacción *in vivo* entre el Cc y CSNKII $\beta$ . 148
- Figura 49.** Complejo formado por el Cc y la ALDOA, determinado mediante técnicas de DOCKING. 149



<b>Figura 50.</b> Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-ALDOA.	<b>150</b>
<b>Figura 51.</b> Representación de los centros de masa de la ALDOA en el complejo Cc-ALDOA.	<b>151</b>
<b>Figura 52.</b> Complejo formado por el Cc y la ANP32B, determinado mediante técnicas de DOCKING.	<b>152</b>
<b>Figura 53.</b> Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-ANP32B.	<b>152</b>
<b>Figura 54.</b> Representación de los centros de masa de la ANP32B en el complejo Cc-ANP32B.	<b>153</b>
<b>Figura 55.</b> Complejo formado por el Cc y la PVALB, determinado mediante técnicas de DOCKING.	<b>154</b>
<b>Figura 56.</b> Complejo formado por el Cc y la PVALB, determinado mediante técnicas de DOCKING, mostrando la superficie de cada uno de los componentes.	<b>155</b>
<b>Figura 57.</b> Representación de los centros de masa de la PVALB en el complejo Cc-PVALB.	<b>156</b>
<b>Figura 58.</b> Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-PVALB.	<b>156</b>
<b>Figura 59.</b> Complejo formado por el Cc y la YWHAE, determinado mediante técnicas de DOCKING.	<b>157</b>
<b>Figura 60.</b> Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-YWHAE.	<b>158</b>

<b>Figura 61.</b> Representación de la superficie del Cc indicando la zona de interacción determinada a partir de los datos de DOCKING.	<b>159</b>
<b>Figura 62.</b> Representación de la superficie del Cc (izquierda) y de la estructura del Cc (derecha).	<b>159</b>
<b>Figura 63.</b> Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la PVALB.	<b>160</b>
<b>Figura 64.</b> Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la ANP32B.	<b>161</b>
<b>Figura 65.</b> Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la ALDOA.	<b>162</b>
<b>Figura 66.</b> Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la YWHAE.	<b>163</b>
<b>Figura 67.</b> Complejo Cc-PVALB determinado mediante DOCKING mostrando la Lys27.	<b>164</b>
<b>Figura 68.</b> Inducción de apoptosis en HEK293T con TG 2 $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de PVALB o de PVALB con Cc (WT y diferentes mutantes).	<b>167</b>
<b>Figura 69.</b> Inducción de apoptosis en HEK293T con CPT 10 $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de NPM o de NPM con Cc WT.	<b>168</b>
<b>Figura 70.</b> Imágenes de la inducción de apoptosis en HEK293T con TG 2 $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de PVALB o de PVALB con Cc (WT y diferentes mutantes).	<b>169</b>
<b>Figura 71.</b> Inducción de apoptosis en HEK293T con CPT 10 $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de NPM o de NPM con Cc WT.	<b>170</b>

<b>Figura 72.</b> Variación del contenido en clorofila en cultivos de <i>A. thaliana</i> tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35 mM.	<b>172</b>
<b>Figura 73.</b> Variación del contenido en proteína en cultivos de <i>A. thaliana</i> tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35 mM.	<b>172</b>
<b>Figura 74.</b> Viabilidad celular en cultivos de <i>A. thaliana</i> tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35 mM (línea discontinua) o no tratados (línea continua) determinada mediante el método de exclusión de azul Trypan.	<b>173</b>
<b>Figura 75.</b> Marcadores de PCD vegetal en cultivos de <i>A. thaliana</i> .	<b>174</b>
<b>Figura 76.</b> Columnas de tiol-sefarosa 4B usadas para la cromatografía de afinidad.	<b>176</b>
<b>Figura 77.</b> Identificación de nuevas dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>177</b>
<b>Figura 78.</b> Análisis de la interacción entre el Cc de <i>A. thaliana</i> y sus nuevas dianas en protoplastos mediante BiFC.	<b>180</b>
<b>Figura 79.</b> Control positivo ( <i>pBiFC-bFosYC155</i> + <i>pBiFC-bJunYN155</i> ) y control negativo ( <i>pBiFC-bFosΔZIPYC155</i> + <i>pBiFC-bJunYN155</i> ) empleados en la realización de los experimentos de BiFC de las dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> en células HEK293T.	<b>182</b>
<b>Figura 80.</b> Localización citoplásmica de las interacciones entre el Cc de <i>A. thaliana</i> y sus dianas eIF2 $\gamma$ y BiP1 determinada mediante BiFC.	<b>183</b>

<b>Figura 81.</b> Localización nuclear de las interacciones entre el Cc de <i>A. thaliana</i> y sus dianas NRP1 y TCL determinada mediante BiFC.	<b>183</b>
<b>Figura 82.</b> Localización núcleo-citoplásmica de las interacciones entre el Cc de <i>A. thaliana</i> y alguna de sus dianas (GLY2, Sm/D1, BiP2 y RD21) determinada mediante BiFC.	<b>184</b>
<b>Figura 83.</b> Localización mitocondrial (0 horas) o citoplásmica (6 horas) de la interacción entre el Cc de <i>A. thaliana</i> y la GAPDC1 determinada mediante BiFC.	<b>185</b>
<b>Figura 84.</b> Comparación de la estructura del Cc de <i>H. sapiens</i> y del Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>187</b>
<b>Figura 85.</b> Comparación de la estructura a nivel de superficie del Cc de <i>H. sapiens</i> y del Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>187</b>
<b>Figura 86.</b> Análisis mediante BiFC de la interacción del Cc de <i>A. thaliana</i> (AtCc) y las dianas del Cc de <i>H. sapiens</i> .	<b>188</b>
<b>Figura 87.</b> Análisis mediante BiFC de la interacción del Cc de <i>H. sapiens</i> (HsCc) y las dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>189</b>
<b>Figura 88.</b> Imágenes mostrando tanto el control positivo (pBiFC-bFosYC155 + pBiFC-bJunYN155) como el control negativo (pBiFC-bFosΔZipYC155 y pBiFC-bJunYN155) usado en los ensayos de BiFC.	<b>189</b>
<b>Figura 89.</b> Identidad del Cc de <i>H. sapiens</i> y el Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>190</b>
<b>Figura 90.</b> Principales funciones de las nuevas dianas del Cc de <i>H. sapiens</i> .	<b>195</b>
<b>Figura 91.</b> Red de interacciones del Cc de <i>H. sapiens</i> .	<b>196</b>

---

<b>Figura 92.</b> Doble papel del Cc durante la apoptosis en mamíferos.	<b>206</b>
<b>Figura 93.</b> Esquema de la red de interacciones del Cc en condiciones apoptóticas en células de mamíferos mostrando la localización de los complejos.	<b>208</b>
<b>Figura 94.</b> Principales funciones de las nuevas dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> .	<b>212</b>
<b>Figura 95.</b> Esquema de la red de interacciones del Cc en condiciones de PCD en células de <i>A. thaliana</i> mostrando la localización de los complejos.	<b>213</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Apoptosis <i>versus</i> Necrosis.	<b>49</b>
<b>Tabla 2.</b> Proteínas implicadas en la regulación de la ruta intrínseca de la apoptosis.	<b>61</b>
<b>Tabla 3.</b> Apoptosis animal <i>versus</i> PCD vegetal.	<b>78</b>
<b>Tabla 4.</b> Genotipo de las distintas estirpes de <i>E. coli</i> empleadas.	<b>87</b>
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de <i>H. sapiens</i> como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en células HK293T.	<b>113</b>
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de <i>A. thaliana</i> como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en protoplastos.	<b>115</b>
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de <i>A. thaliana</i> como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en células HEK293T.	<b>117</b>
<b>Tabla 8.</b> Archivos de estructura PDB.	<b>122</b>
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos usados para la obtención de los distintos mutantes de Cc.	<b>122</b>
<b>Tabla 10.</b> Dianas del Cc de <i>H. sapiens</i> identificadas mediante cromatografía de afinidad y MALDI-TOF/MS.	<b>138</b>
<b>Tabla 11.</b> Dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> identificadas mediante cromatografía de afinidad y nanoLc-MS/MS.	<b>178</b>





## ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

<b>2D SDS-PAGE</b>	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
<b>35s</b>	Promotor 35s
<b><i>A. thaliana</i></b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AIF</b>	Factor inductor de la apoptosis
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>APAF1</b>	Factor 1 activador de proteasa de apoptosis
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico transferente
<b>ASK1</b>	Quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1
<b>BH</b>	Homología a Bcl-2
<b>BiFC</b>	Complementación bimolecular de la fluorescencia
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C-YFP</b>	Fragmento C-terminal de la proteína fluorescente amarilla
<b>CAD</b>	ADNasa activada por caspasas
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento de caspasas

<b>Cc</b>	Citocromo c
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>dATP</b>	Trifosfato de desoxiadenosina
<b>DED</b>	Dominio efector de muerte
<b>DISC</b>	Complejo señalizador inductor de muerte
<b>dNTP</b>	Trifosfato de desoxinucleótidos
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacetato de sodio
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente aumentada
<b>EndoG</b>	Endonucleasa G
<b>FADD</b>	Dominio de muerte asociado a Fas
<b>FasR</b>	Receptor de FasL
<b>FasL</b>	Ligando Fas
<b>g</b>	Aceleración gravitatoria terrestre
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HEK293T</b>	Células embrionarias de riñón 293T
<b><i>H. sapiens</i></b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>IAP</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis
<b>ICAD</b>	Inhibidor de la ADNasa activada por caspasas
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque

<b>IPG</b>	Gradiente de pH inmovilizado
<b>IRF</b>	Factor regulador del interferón
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple
<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>IMS</b>	Espacio intermembrana
<b>MOMP</b>	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
<b>MPTP</b>	Poro de transición de permeabilidad de la mitocondria
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MS</b>	Medio Murashige-Skoog
<b>MW</b>	Peso molecular
<b>N-YFP</b>	Fragmento N-terminal de la proteína fluorescente amarilla
<b>NAA</b>	Ácido naftalenacético
<b>nanoLC</b>	Nano cromatografía líquida
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>p/v</b>	Relación peso / volumen
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PBS</b>	Tampón salino fosfato
<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>pCMV</b>	Promotor de virus del mosaico de la coliflor
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

<b>PDI5</b>	Proteína isomerasa de disulfuros 5
<b>PDK</b>	Proteína quinasa dependiente de fosfatidil-inositoles
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>pI</b>	Punto isoelectrico
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKR</b>	Proteína quinasa inducida por interferón
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPA</b>	Precursor de la proteína amiloide
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sodio
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SLPA</b>	Síndrome linfoproliferativo autoinmune
<b>snRNP</b>	Ribonucleoproteína nuclear pequeña
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TNFR1</b>	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TS-4B</b>	Tiol-sefarosa 4B
<b>UV</b>	Ultravioleta

---

<b>V</b>	Voltios
<b>v/v</b>	Relación volumen / volumen
<b>VDAC1</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje 1
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>WT</b>	Silvestre
<b>YFP</b>	Proteína fluorescente amarilla
<b>z-VAD-fmk</b>	Benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp fluorometilcetona

**BASES NITROGENADAS**

<b>A</b>	Adenosina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T</b>	Timina

**AMINOÁCIDOS**

<b>A</b>	Ala	Alanina
<b>R</b>	Arg	Arginina
<b>N</b>	Asn	Asparagina
<b>D</b>	Asp	Aspartato
<b>C</b>	Cys	Cisteína
<b>E</b>	Glu	Glutamato
<b>Q</b>	Gln	Glutamina
<b>G</b>	Gly	Glicina
<b>H</b>	His	Histidina
<b>I</b>	Ile	Isoleucina
<b>L</b>	Leu	Leucina
<b>K</b>	Lys	Lisina
<b>M</b>	Met	Metionina
<b>F</b>	Phe	Fenilalanina
<b>P</b>	Pro	Prolina
<b>S</b>	Ser	Serina
<b>T</b>	Thr	Treonina
<b>W</b>	Trp	Triptófano
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina
<b>V</b>	Val	Valina

## 1. INTRODUCCIÓN

*“Sabemos tan poco acerca de la vida.  
¿Cómo podremos saber algo acerca de la muerte?”  
(Confucio)*





## 1.1. Muerte Celular: Algo de Historia

La organización celular de los organismos fue descubierta a mediados del siglo XIX por Schwann y Schleiden (1847). Poco tiempo después se puso de manifiesto que la muerte celular representaba una parte esencial del desarrollo animal (Vogt, 1884). Observada en primer lugar durante la metamorfosis de los anfibios (Vogt, 1884), pronto se puso de manifiesto que la muerte celular ocurría de forma normal en el desarrollo de muchos tejidos, tanto en vertebrados como en invertebrados (Glucksmann, 1951; Clarke y Clarke, 1996). Posteriormente, se descubrió que el uso de inhibidores de la síntesis de ARN o de proteínas, inhibía la muerte celular que ocurría durante la metamorfosis tanto de anfibios (Tata, 1966) como de insectos (Lockshin, 1969), indicando que la muerte celular requería de la síntesis macromolecular, siendo, por lo tanto, un proceso controlado a nivel celular.

El término muerte celular programada (PCD, del inglés, *Programmed Cell Death*) fue inicialmente usado para describir la muerte celular que ocurría en sitios y momentos predecibles durante el desarrollo de los organismos (Lockshin y Williams, 1969). Sin embargo, quedaba claro que algunos de estos eventos de muerte celular podían ser prevenidos por sustancias liberadas por otros tejidos, indicando que estas muertes no eran inevitables y podían ser suprimidas mediante señales provenientes de otras células (Saunders, 1966).

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie (Kerr *et al.*, 1972), reunieron una serie de evidencias experimentales, tanto propias como ajenas, con las que consiguieron establecer una clara separación entre la muerte celular que ocurre durante la homeostasis y el desarrollo tisular y aquella que se produce en sitios de lesiones agudas. En el segundo caso, las células y sus orgánulos

tienden a hincharse y reventar en un proceso conocido como necrosis celular, el cual implica la liberación del contenido celular, lo que, normalmente, induce una respuesta inflamatoria. Por el contrario, cuando las células mueren durante el desarrollo, o como consecuencia de la homeostasis celular, frecuentemente se observa tanto encogimiento celular como condensación citoplásmica, mientras que tanto los orgánulos como la membrana plasmática mantienen su integridad en un proceso que Kerr y colaboradores denominaron apoptosis (del griego, *apó*: separación y *ptôsis*: caída). A diferencia de lo que sucede durante la necrosis, en la apoptosis las células muertas o sus fragmentos son fagocitados por las células vecinas o por macrófagos, antes de que se produzca la liberación de los contenidos intracelulares, evitándose de este modo una respuesta inflamatoria.

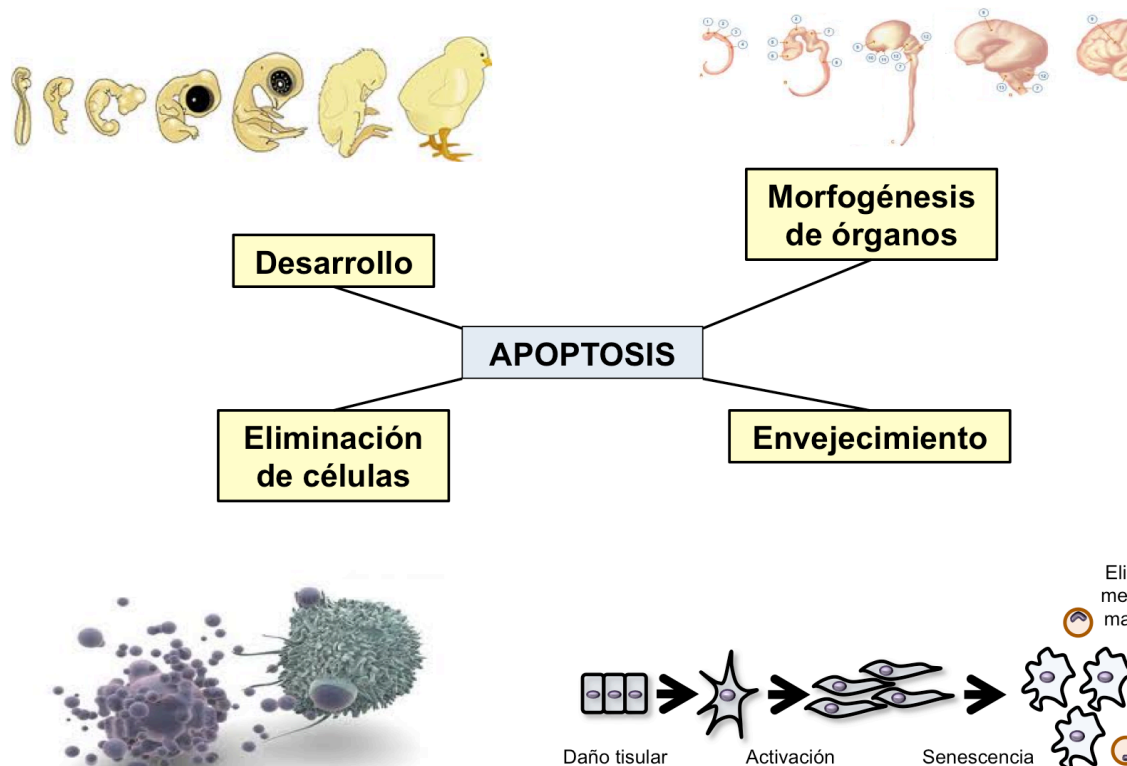
Kerr y colaboradores constataron que la muerte celular apoptótica es muy similar en tejidos y organismos diferentes, por lo que propusieron que este fenómeno reflejaba la existencia de un programa activo e intracelular de muerte celular, que podía ser activado o inhibido por diferentes estímulos, tanto fisiológicos como patológicos.

A pesar de ello, la aceptación de la existencia de un proceso de PCD llevó más de 20 años y fue posible, principalmente, gracias a estudios genéticos llevados a cabo en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), un gusano de no más de 1 mm de longitud. Estos estudios (Horvitz *et al.*, 1982; Ellis y Horvitz, 1986) permitieron la identificación de genes dedicados al proceso de la PCD, así como a su control. Esto se vio finalmente apoyado por el descubrimiento de que algunos de estos genes eran homólogos a genes de mamíferos (Yuan *et al.*, 1993; Hengartner y Horvitz, 1994).

Con esta aceptación, el término PCD ha pasado a tener un significado diferente al original. Ahora se emplea generalmente para referirse a cualquier tipo de muerte celular mediada por un programa intracelular, sin importar qué lo provoca y si presenta o no todas las características que describen la apoptosis (Jacobson *et al.*, 1997).

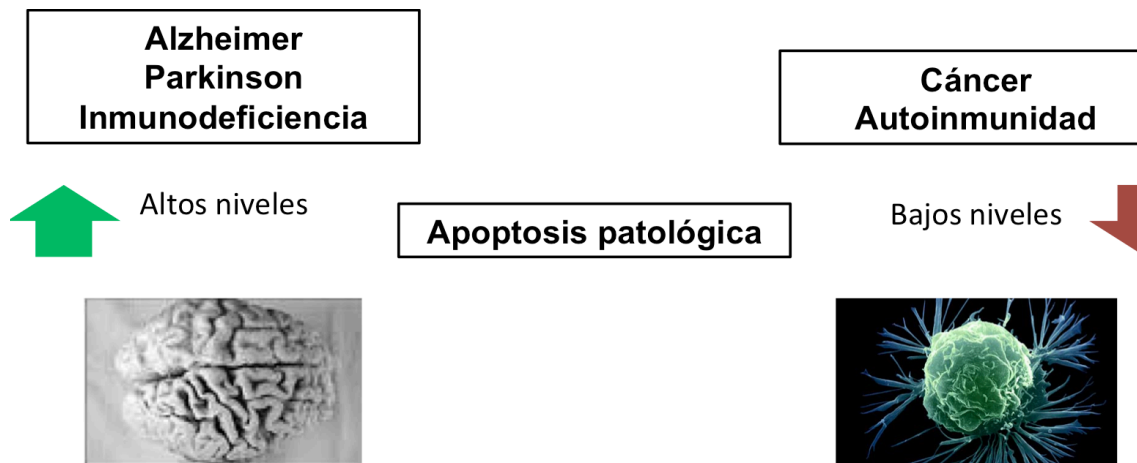
## 1.2. Muerte Celular en Mamíferos

La muerte celular es una propiedad fundamental en la fisiología normal de todos los organismos multicelulares, siendo crucial para el desarrollo, la morfogénesis de los órganos, el envejecimiento y la eliminación de células infectadas o dañadas (Jacobson *et al.*, 1997) (Figura 1).



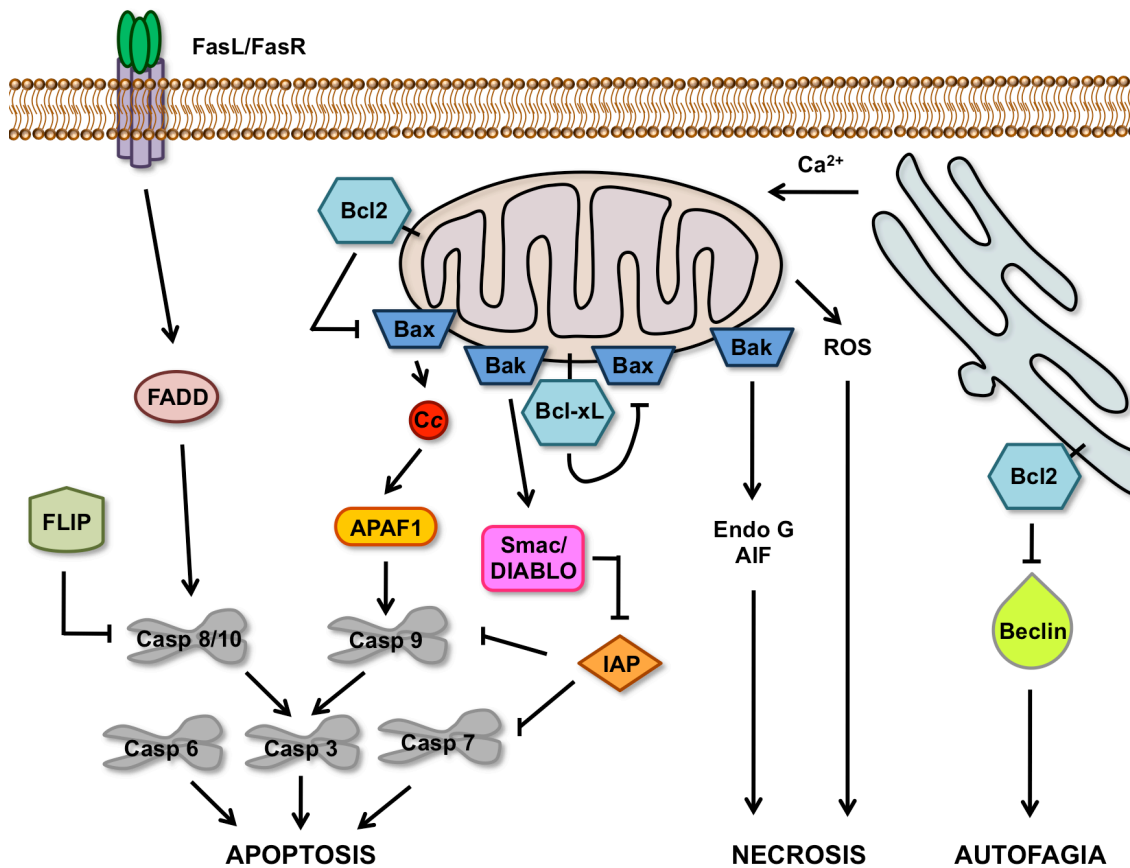
**Figura 1. Apoptosis en condiciones fisiológicas.** Procesos fisiológicos en los que interviene la apoptosis en organismos multicelulares.

A pesar de esto, la muerte celular también puede tener una vertiente patológica, ya que se ha demostrado que su desregulación está relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades, de modo que un elevado nivel de muerte celular ha sido relacionado con la inmunodeficiencia y las enfermedades neurodegenerativas, mientras que una muerte celular disminuida parece estar implicada en el desarrollo de la autoinmunidad y el cáncer (Thompson, 1995; Rudin y Thompson, 1997) (Figura 2).



**Figura 2. Apoptosis en condiciones patológicas.** Enfermedades cuyo desarrollo está relacionado con una apoptosis patológica, bien por un exceso en los niveles de apoptosis (Alzheimer, Parkinson, inmunodeficiencia) o por un defecto (cáncer, autoinmunidad).

Se ha demostrado que la activación del suicidio celular se encuentra controlada por diversas rutas endógenas, aunque los mecanismos subyacentes que controlan algunas de estas rutas aún permanecen por determinar. Aún así, se pueden establecer tres grandes tipos de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis (Reed, 2006) (Figura 3).



**Figura 3. Principales rutas de muerte celular.** Esquema de las tres grandes rutas de muerte celular descritas en vertebrados: apoptosis, necrosis y autofagia.

### 1.2.1. Apoptosis

Las rutas de muerte celular que cumplen los requisitos de la apoptosis son aquellas en las que tiene lugar la activación de proteasas intracelulares conocidas como caspasas (Salvesen, 2002). Estas proteasas, de las cuales en humanos se han descrito 12 (Walsh y Martin, 2009), funcionan de forma jerárquica, actuando aguas arriba como proteasas iniciadoras o aguas abajo como proteasas efectoras. Por lo tanto, las caspasas se cortan y activan unas a otras generando una cascada proteolítica (Boatright y Salvesen, 2003). Además, estas proteasas son las responsables de la proteólisis de sustratos proteicos específicos, produciendo el fenómeno de la apoptosis, en el cual las

células se despegan de la matriz extracelular, se redondean y encogen, y alteran su distribución de lípidos en la membrana plasmática, señalizando así su eliminación mediante fagocitosis.

Las caspasas están presentes como zimógenos inactivos dentro de la mayoría de las células animales. Normalmente, la activación de las caspasas iniciadoras ocurre mediante su interacción con proteínas que favorecen su agrupamiento, lo que finalmente conduce a la activación de estos zimógenos (Boatright y Salvesen, 2003). Una vez activadas, estas caspasas iniciadoras cortan y activan a las caspasas efectoras (Figura 3).

### **1.2.2. Autofagia**

Se trata de una respuesta ante la privación de nutrientes, que se encuentra conservada evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos (Díaz-Troya *et al.*, 2008), mediante la cual macromoléculas y orgánulos son catabolizados mediante procesos dependientes de los lisosomas, generando sustratos con el objetivo de mantener la energía y la síntesis de proteínas. Cuando este proceso ocurre en exceso, la autofagia termina causando la muerte celular (Levine, 2005).

### **1.2.3. Necrosis**

Además de la muerte celular dependiente de caspasas, se han descrito muchos mecanismos alternativos de muerte celular que no resultan en apoptosis. Concretamente, se conoce una amplia variedad de tipos de estrés celular y lesiones, así como la desregulación de diversos oncogenes, que conducen a una división celular no apropiada, permitiendo la evasión de los

puntos de control del ciclo celular, lo que conduce a la activación de un mecanismo de muerte celular que implica a la mitocondria (Kroemer y Reed, 2000; Evan y Vousden, 2001), pero que es independiente de caspasas. Esto, en conjunto, provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, del inglés *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*), lo que conduce a la generación de radicales libres tóxicos (Green y Kromer, 2004; Spierings *et al.*, 2005). Estos mecanismos independientes de caspasas activados por la MOMP inducen muerte celular con características de necrosis (Green y Kromer, 2004; Spierings *et al.*, 2005), un proceso en el cual las células se hinchan y explotan, conduciendo a una respuesta inflamatoria (Figura 3).

### 1.3. La Apoptosis: Un Proceso Estrechamente Controlado

La apoptosis representa el mecanismo esencial mediante el cual los organismos multicelulares eliminan células no deseadas durante el desarrollo o la homeostasis (Jacobson *et al.*, 1997; Raff, 1998). Este proceso, estrictamente controlado tanto a nivel genético como bioquímico, implica la fragmentación del ADN, la aparición de ampollas en la membrana plasmática, el encogimiento celular y el desmantelamiento de la célula en vesículas. Finalmente, estas vesículas son eliminadas mediante fagocitosis, por lo que al no liberarse el contenido intracelular al medio intersticial se consigue evitar una respuesta inflamatoria.

Igualmente, la desregulación de la apoptosis ha sido relacionada con un número creciente de desórdenes clínicos. Concretamente, se ha propuesto que una excesiva apoptosis puede conducir a enfermedades neurodegenerativas,

mientras que el cáncer y las enfermedades autoinmunes pueden generarse, al menos en parte, como consecuencia de niveles insuficientes de apoptosis (Cryns y Yuan, 1998).

Nuestro conocimiento acerca de los mecanismos implicados en el control de la apoptosis en mamíferos, procede en gran medida del estudio de la PCD que tiene lugar durante el desarrollo en *C. elegans* (Horvitz, 1999). En este organismo durante el desarrollo se generan 1090 células, de las cuales 131 serán eliminadas mediante apoptosis. Estas 131 células mueren en puntos concretos durante el desarrollo, lo cual es invariable entre distintos gusanos, lo que demuestra la enorme precisión y control que gobiernan este fenómeno, permitiéndonos asimismo entender su vital importancia.

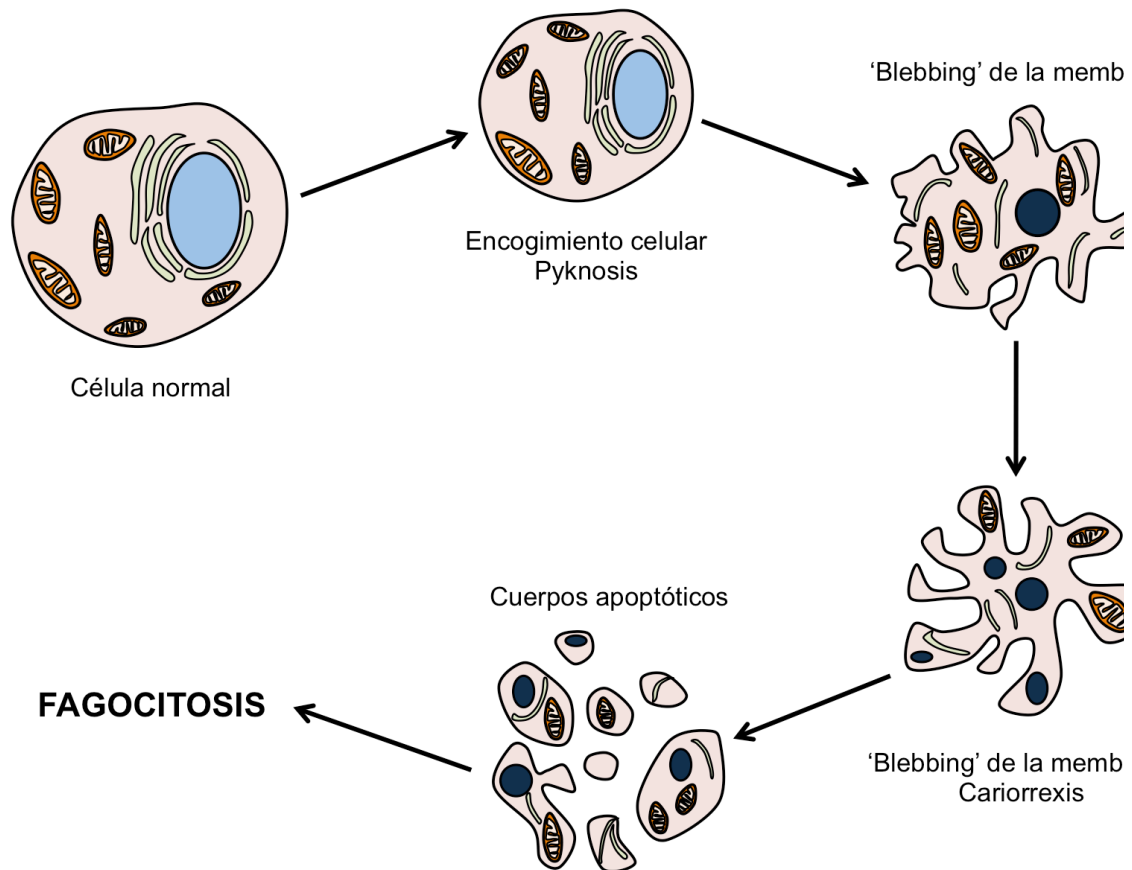
### **1.3.1. Morfología de la Apoptosis**

Los cambios morfológicos que se producen en las células durante el desarrollo de la apoptosis (Figura 4) han sido ampliamente estudiados mediante microscopía visible y microscopía electrónica (Hacker, 2000).

Durante la apoptosis temprana, mediante microscopía visible se pueden observar tanto el encogimiento celular como la *pyknosis* (del griego, condensación irreversible de la cromatina), la cual representa la principal característica morfológica de la apoptosis. Por su parte, el encogimiento celular resulta en células más pequeñas, lo que se produce como consecuencia de la condensación del contenido citoplásmico y por el mayor empaquetamiento de los orgánulos. Posteriormente, se produce la aparición en la membrana plasmática de ampollas, en un fenómeno conocido como “blebbing”, y la *cariorrhexis* (del griego, fragmentación del núcleo). Finalmente, se produce la



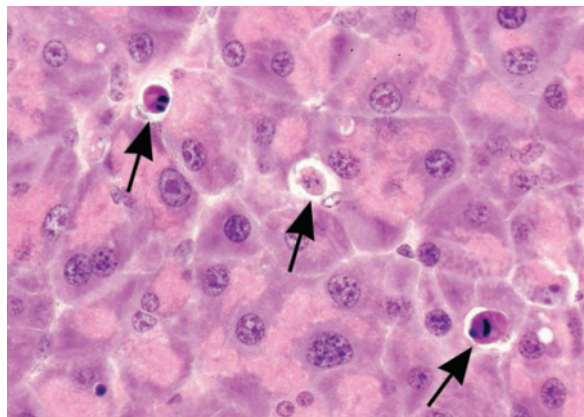
aparición de los cuerpos apoptóticos, los cuales son eliminados por medio de la fagocitosis.



**Figura 4. Cambios morfológicos que caracterizan a la apoptosis.** Una vez iniciado el proceso apoptótico, la célula sufre un encogimiento citoplásmico y nuclear. Posteriormente, se produce la aparición de ampollas en la membrana plasmática (o “blebbing”) y la *cariorrexis* (fragmentación del núcleo), tras lo que se produce la generación de los cuerpos apoptóticos, que son finalmente fagocitados.

En preparaciones tisulares teñidas con hematoxilina, empleada para la tinción de los núcleos celulares debido a su afinidad por compuestos aniónicos, y eosina, con afinidad por compuestos basófilos (por ej. orgánulos citoplásmicos) pero no núcleos, observadas mediante microscopía visible, las células apoptóticas aparecen como masas redondeadas. En este tipo de preparaciones el citoplasma aparece teñido en rosa por la eosina, mientras que

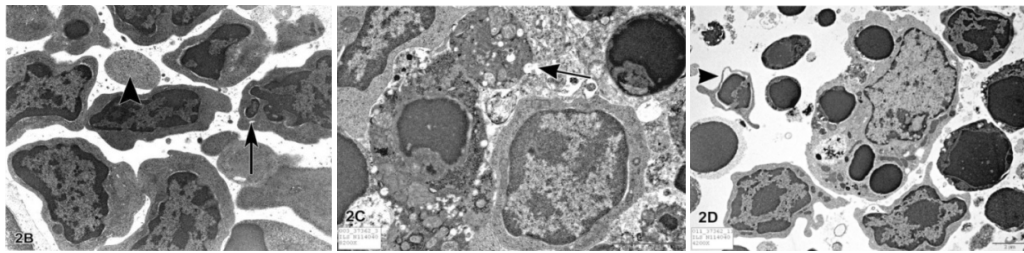
los fragmentos de cromatina nuclear aparecen teñidos en púrpura por la hematoxilina (Figura 5).



**Figura 5. Visualización de células apoptóticas mediante microscopía visible.** Identificación de células apoptóticas mediante tinción eosina/hematoxilina. Las flechas señalan células apoptóticas en las que se aprecia tanto la reducción del volumen celular, consecuencia de la condensación del citoplasma, como la condensación nuclear. Elmore, 2007.

Por su parte, la microscopía electrónica nos ayuda a entender mejor estos cambios morfológicos. Inicialmente, durante la condensación de la cromatina, el material nuclear agrega periféricamente bajo la membrana nuclear (Figura 6, panel izquierdo), aunque también pueden aparecer núcleos uniformemente densos. Por su parte, la aparición de ampollas en la membrana plasmática sucede tras la *cariorrhexis* y la separación de los fragmentos celulares en cuerpos apoptóticos (Figura 6, panel central). Estos cuerpos apoptóticos constan de citoplasma, con orgánulos altamente empaquetados, pudiendo o no presentar fragmentos nucleares. La integridad de estos orgánulos aún está mantenida, y todos se encuentran encerrados dentro de una membrana plasmática igualmente intacta. Posteriormente, estos cuerpos son fagocitados por macrófagos y degradados dentro de los fagolisosomas (Figura 6, panel derecho). En la apoptosis no se produce una respuesta inflamatoria por tres motivos principales: 1) las células apoptóticas no liberan su contenido

intracelular al tejido intersticial que las rodea, 2) se produce una rápida fagocitosis por las células vecinas, evitándose de este modo una necrosis secundaria y 3) las células encargadas de la fagocitosis tampoco producen citoquinas anti-inflamatorias (Savill y Fadok, 2000; Kurosawa *et al.*, 2003).



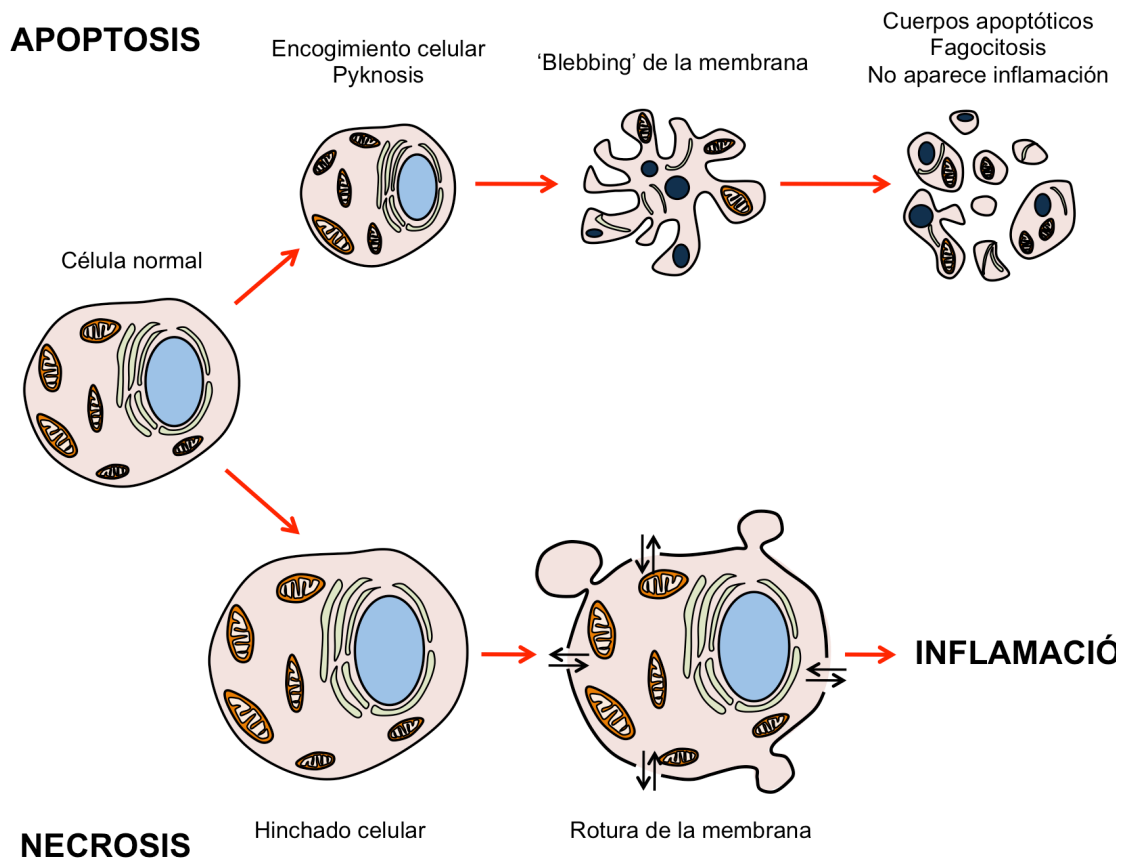
**Figura 6. Visualización de células apoptóticas mediante microscopía electrónica.** Se muestran distintos eventos característicos de la apoptosis. *Panel izquierdo:* condensación del contenido nuclear; *panel central:* fragmentación del núcleo y aparición de cuerpos apoptóticos; *panel derecho:* fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. Elmore, 2007.

### 1.3.2. Apoptosis versus Necrosis

La necrosis representa la alternativa a la apoptosis, siendo considerada como un proceso tóxico en el que la célula es una víctima pasiva de un proceso de muerte celular independiente de energía.

Aunque la apoptosis y la necrosis son procesos morfológica y mecanísticamente bien diferenciables (Figura 7), existe cierta superposición. Actualmente, las evidencias experimentales parecen apuntar a que la apoptosis y la necrosis no son más que expresiones morfológicas diferenciales de una misma red bioquímica subyacente, descrita como “continuo apoptosis-necrosis” (Zeiss, 2003). Parece, por lo tanto, que existen múltiples factores, tales como la señal que desencadena la muerte celular, el tipo de tejido, la fase de desarrollo del tejido y el estado fisiológico, implicados en determinar si una

célula muere mediante apoptosis o mediante necrosis (Fiers *et al.*, 1999; Zeiss, 2003).



**Figura 7. Apoptosis versus Necrosis.** El proceso apoptótico se caracteriza por una reducción del volumen celular mediado por la condensación tanto del citoplasma como del núcleo, una fragmentación nuclear y la generación de cuerpos apoptóticos que son, finalmente, eliminados por fagocitosis. En cambio la necrosis se caracteriza por un aumento del volumen celular, que provoca la rotura de la membrana plasmática, liberando al exterior el contenido intracelular, lo que causa un proceso inflamatorio. Adaptada de Ueda y Shah, 2000.

La necrosis constituye un fenómeno pasivo, descontrolado e independiente de energía, que generalmente afecta a grandes números de células, mientras que la apoptosis es un proceso controlado y dependiente de energía, que suele afectar a una célula o a pequeños grupos de células. A continuación, se comparan las principales características morfológicas que permiten distinguir entre la apoptosis y la necrosis (Tabla 1).

APOPTOSIS	NECROSIS
Una célula o pequeños grupos de células	Grandes grupos de células
Encogimiento celular	Hinchado celular
<i>Pyknosis</i> y <i>cariorrhexis</i>	Cariolisis, <i>pyknosis</i> y <i>cariorrhexis</i>
Membrana celular intacta	Rotura de la membrana celular
Citoplasma retenido en cuerpos apoptóticos	Liberación del contenido intracelular
No aparece inflamación	Usualmente aparece inflamación

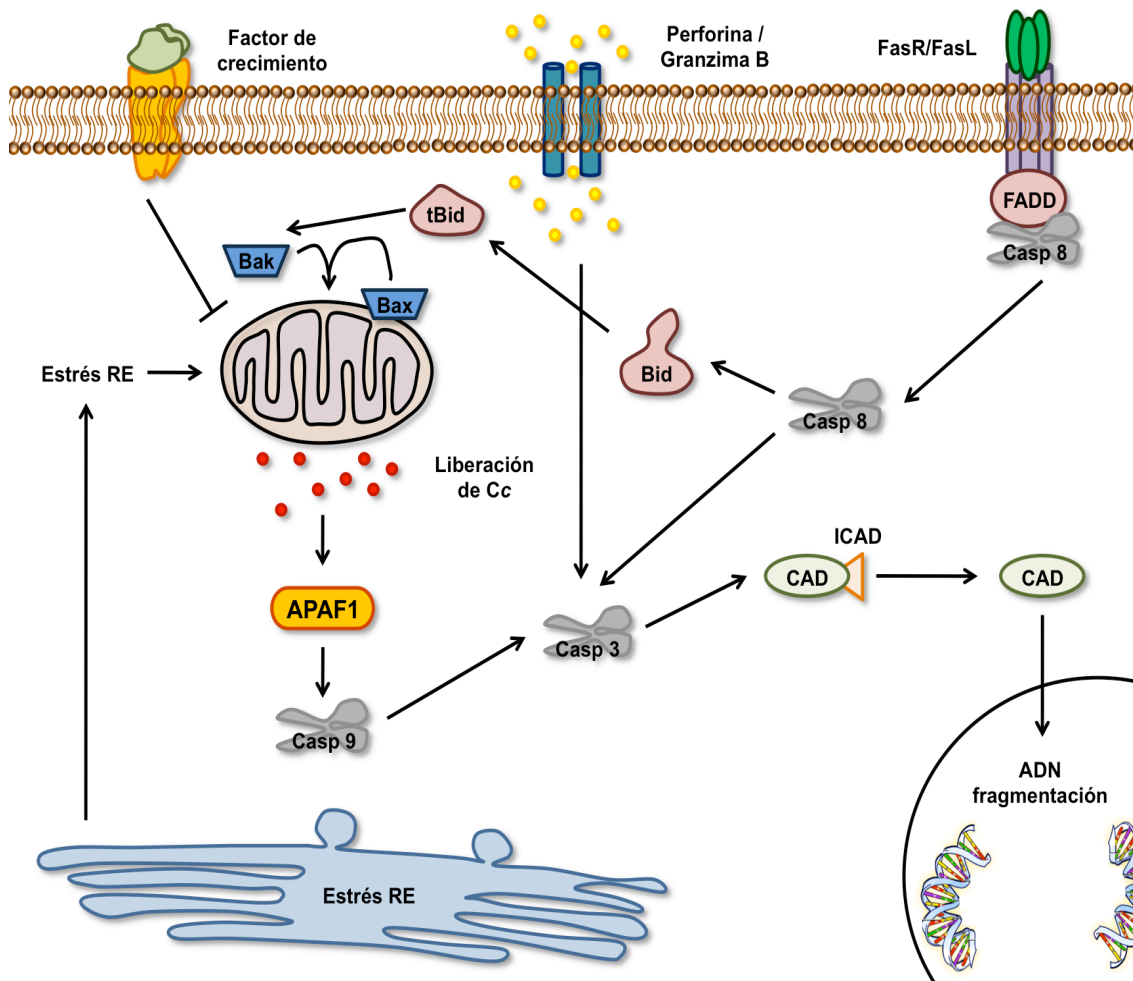
**Tabla 1. Apoptosis versus Necrosis.** Comparación de las principales características que definen a la apoptosis y a la necrosis, las cuales permiten distinguir ambos procesos a nivel morfológico. Adaptada de Elmore, 2007.

### 1.3.3. Rutas Apoptóticas

Actualmente, los datos experimentales indican la existencia de dos rutas apoptóticas principales: 1) la ruta extrínseca o dependiente de receptor (Kramer, 2000), y 2) la ruta intrínseca o mitocondrial (Suen *et al.*, 2008). Adicionalmente, existe una tercera ruta que implica la citotoxicidad mediada por linfocitos T y la muerte de la célula dependiente de la perforina/granzima. Esta tercera ruta es capaz de inducir apoptosis mediante la granzima B o la granzima A. Estas tres grandes rutas, responsables tanto de la activación como de la regulación de la apoptosis, se esquematizan a continuación en la Figura 8.

Las rutas extrínseca, intrínseca y la de la granzima B convergen en la caspasa-3, provocando la fragmentación del ADN y la degradación de proteínas del citoesqueleto y del núcleo, la formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para los receptores de las células fagocíticas y, finalmente, la degradación celular mediada por fagocitosis. Por su parte, la ruta de la

granzima A activa una ruta paralela e independiente de caspasas mediante daño de cadena simple en el ADN (Martinvalet *et al.*, 2005).



**Figura 8. Principales rutas de control de la apoptosis en mamíferos.** Ruta intrínseca (izquierda), extrínseca (derecha) y de la Perforina/Granzima B (centro). *Ruta intrínseca:* tanto la ausencia de factores de crecimiento como el estrés del retículo endoplásmico (RE) se perciben a nivel de la mitocondria, provocando la liberación de citocromo c (Cc), que activa la cascada proteolítica que conduce a la muerte celular. *Ruta Perforina/Granzima B:* la perforina, liberada por los linfocitos T citotóxicos, genera poros en la membrana plasmática de la célula diana, a través de los cuales se introduce la granzima B, que puede activar directamente a la caspasa-3, activando la muerte celular. *Ruta extrínseca:* el reconocimiento de un ligando extracelular (por ej. FasL) por parte de su receptor (por ej. FasR) causa la activación de la caspasa-8, la cual puede activar directamente a la caspasa-3, promoviendo así la muerte celular. Igualmente, la caspasa-8 puede activar a Bid dando lugar a tBid, que actúa sobre la mitocondria, conectando de este modo la ruta extrínseca y la intrínseca.

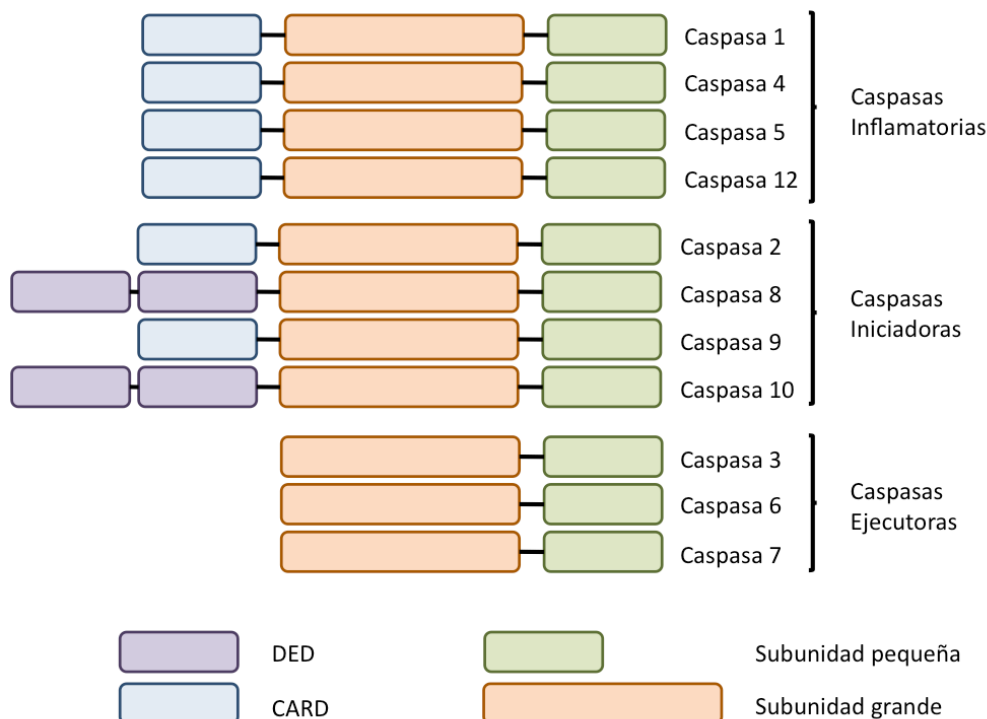
### 1.3.3.1. Características Bioquímicas

Las células apoptóticas exhiben varias modificaciones bioquímicas, tales como la proteólisis proteica mediada por caspasas, el entrecruzamiento de proteínas, la rotura del ADN y el reconocimiento fagocítico (Hengartner, 2000).

Las caspasas son ampliamente expresadas como zimógenos inactivos en la mayoría de las células que, una vez activados, pueden activar a otras procaspasas, conduciendo, de este modo, al inicio de la cascada proteolítica, la cual representa una de las principales características de la apoptosis. Esta cascada proteolítica, en la cual una caspasa activa a otras caspasas, permite la amplificación de la ruta de señalización apoptótica, lo que promueve una rápida muerte celular. La actividad proteolítica de las caspasas les permite cortar otras proteínas en residuos de aspartato, aunque la especificidad acerca de las secuencias de reconocimiento varía entre las distintas caspasas. Hasta la fecha se han conseguido identificar 11 caspasas principales, que se han distribuido en tres grandes grupos: caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10), caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) y caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4, -5 y -12) (Cohen, 1997; Rai *et al.*, 2005) (Figura 9).

Aparte de estas caspasas principales, las otras caspasas que se han identificado son la caspasa-11, la cual parece regular la apoptosis y la maduración de las citoquinas durante el choque séptico, la caspasa-13, la cual parece ser un gen bovino, y la caspasa-14, la cual es altamente expresada en tejido embrionario, pero no en tejido adulto (Hu *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000; Koenig *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002).





**Figura 9. Esquema de la organización en dominios de las caspasas humanas.** Esquema de los dominios de las principales caspasas humanas: inflamatorias, iniciadoras y ejecutoras. CARD: dominio de reclutamiento de caspasas; DED: dominio efector de muerte.

Otra característica bioquímica de las células apoptóticas es el entrecruzamiento de proteínas, que se produce como consecuencia de la expresión y activación de transglutaminasas (Nemes *et al.*, 1996).

También se produce la rotura del ADN como consecuencia de la acción de endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , dando lugar a fragmentos que se diferencian en su tamaño en 180 ó 200 pares de bases (Bortner *et al.*, 1995). Esto permite la observación de una escalera de ADN característica, que se visualiza al separar el ADN genómico de células apoptóticas mediante electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta.

Igualmente, la expresión de marcadores celulares de superficie, los cuales permiten un reconocimiento fagocítico temprano de las células apoptóticas y,



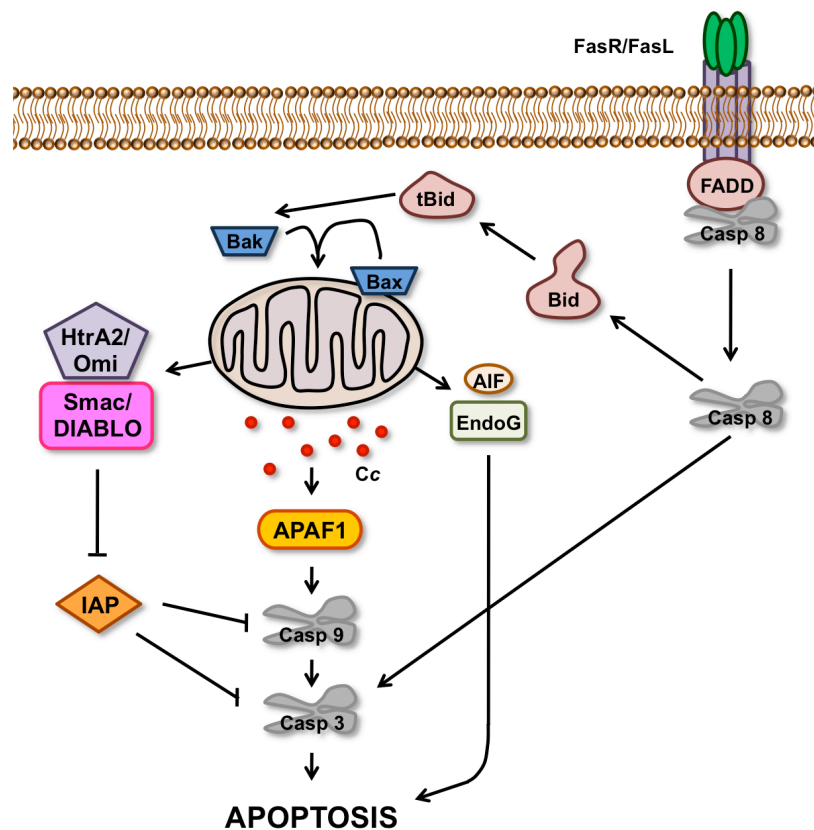
de este modo, una rápida fagocitosis que garantiza el mínimo riesgo para las células de alrededor, constituye otra de las características bioquímicas de la apoptosis. Esto se alcanza mediante el movimiento de la fosfatidilserina desde la cara interna hacia la cara externa de la bicapa lipídica (Bratton *et al.*, 1997). Aunque, la fosfatidilserina es un ligando reconocido por los fagocitos, estudios recientes han demostrado que otras proteínas son expuestas en la superficie celular durante la eliminación de células apoptóticas, entre las que se encuentran la anexina V y la calreticulina.

La anexina V es una proteína que interacciona fuerte y específicamente con residuos de fosfatidilserina, por lo que es usada para la detección de la apoptosis (Arur *et al.*, 2003). Por su parte, la calreticulina se une a una proteína relacionada con el receptor del LDL (del inglés, *Low Density Lipoprotein*) sobre la célula que fagocita, y se ha sugerido que coopera con la fosfatidilserina como señal de reconocimiento (Gardai *et al.*, 2005). La glicoproteína adhesiva trombospondina-1 puede ser expresada en la superficie externa de células endoteliales microvasculares activadas y, conjuntamente con CD36, proteasas similares a la caspasa-3 y otras proteínas, inducen apoptosis mediada por receptor (Jiménez *et al.*, 2000).

#### **1.3.3.2. Ruta Extrínseca**

La apoptosis iniciada por la ruta de señalización extrínseca implica interacciones mediadas por receptores transmembrana de la superfamilia de receptores TNF (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) (Locksley *et al.*, 2001) (Figura 10). Actualmente, los complejos ligando/receptor mejor caracterizados son FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5

(Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998; Peter y Kramer, 1998; Suliman *et al.*, 2001; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005).



**Figura 10. Ruta extrínseca de la apoptosis.** El reconocimiento de FasL por parte de su receptor FasR conduce a la activación de la caspasa-8, la cual puede activar directamente la cascada proteolítica, activando a la caspasa-3, o bien cortar a la proteína Bid, dando lugar a la forma trunca y activa (tBid), la cual actúa a nivel de la mitocondria. tBid provoca la permeabilización de la MOMP permitiendo la liberación de factores pro-apoptóticos (Cc, HtrA2/Omi, Smac/DIABLO, AIF, EndoG), de modo que tBid sirve como nexo de unión entre la ruta intrínseca y la ruta extrínseca de activación de la apoptosis. Adaptada de Zhang *et al.*, 2005.

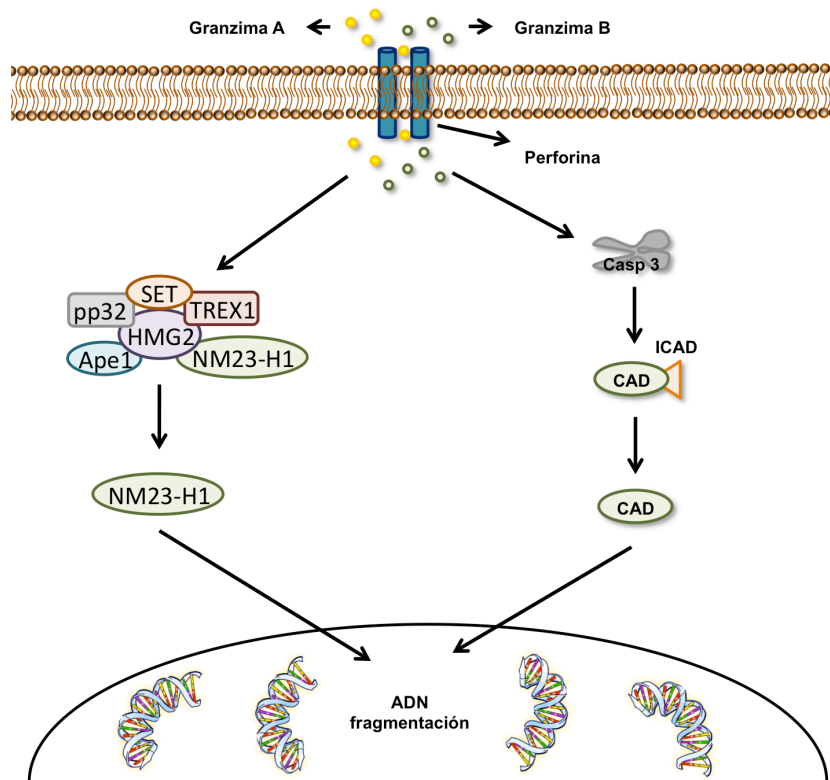
En la ruta extrínseca, el reconocimiento del ligando (por ej. FasL) por parte del receptor (por ej. FasR) conduce a la oligomerización del receptor, lo que permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras (por ej. FADD). Estas proteínas adaptadoras permiten el reclutamiento de la procaspasa-8. En este momento, se ha formado el denominado como complejo señalizador inductor

de muerte (DISC, del inglés **Death-Inducing Signaling Complex**), resultando en la activación autocatalítica de la procaspasa-8 (Kischkel *et al.*, 1995). Una vez que la caspasa-8 se ha activado, se dispara la fase de ejecución de la apoptosis.

#### 1.3.3.3. Ruta Perforina/Granzima

Los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés **Cytotoxic T Lymphocytes**) son capaces de matar células diana a través de la ruta extrínseca, siendo la interacción FasL/FasR el método principal por el que los CTL inducen apoptosis (Brunner *et al.*, 2003). Sin embargo, los CTL también son capaces de inducir muerte celular sobre células tumorales o infectadas por virus mediante la secreción de perforina. La perforina es capaz de formar poros en la membrana de la célula diana, a través de los cuales los CTL secretan gránulos citoplásmicos en el interior de la célula diana (Trapani y Smyth, 2002) (Figura 11), siendo las granzimas A y B los componentes más importantes dentro de estos gránulos (Elmore, 2007).

Se ha descrito que la granzima B puede cortar proteínas en residuos de aspartato, por lo tanto, siendo capaz de activar a la procaspasa-3 y de inactivar al inhibidor de la ADNasa activada por caspasas (ICAD, del inglés **Inhibitor of Caspases Activated DNase**) (Sakahira *et al.*, 1998). También se ha propuesto que la granzima B puede activar la ruta mitocondrial, mediante la activación proteolítica de Bid y la liberación de Cc (Barry y Bleackley, 1998; Russel y Ley, 2002). Aún así, la granzima B es capaz también de activar directamente a la caspasa-3, eliminándose de este modo la ruta de señalización, por lo que se pasa directamente a la activación de la fase de ejecución de la apoptosis.



**Figura 11. Ruta Perforina/Granzima de la apoptosis.** Los poros generados por la perforina permiten la entrada en la célula diana tanto de la granzima A como de la granzima B. La granzima A actúa sobre el complejo SET, promoviendo la liberación de la nucleasa NM23-H1, que provoca daños a nivel del ADN, lo que conduce a la apoptosis. Por su parte, la granzima B activa a la caspasa-3, la cual corta e inactiva a ICAD, permitiendo así la liberación de la nucleasa CAD (del inglés, *Caspase Activated DNase*), la cual causa daños en el ADN activando la respuesta apoptótica.

La granzima A es también importante para la apoptosis inducida por CTL, al estar implicada en la activación de rutas independientes de caspasas. Una vez en la célula, la granzima A activa cortes en el ADN a través de la ADNasa NM23-H1 (Fan *et al.*, 2003). En condiciones homeostáticas, la proteína SET se encuentra inhibiendo a NM23-H1, pero la granzima A es capaz de cortar a la proteína SET, liberando de este modo a NM23-H1, promoviendo la degradación apoptótica del ADN. Además de inhibir a NM23-H1, el complejo SET (formado por SET, Ape1, pp32, HMG2, TREX1 y NM23-H1) parece tener

funciones importantes en la reparación del ADN (Lieberman y Fan, 2003). Por lo tanto, la inactivación de este complejo por medio de la granzima A también contribuye a la apoptosis, al bloquear tanto el mantenimiento del ADN como la integridad de la estructura de la cromatina.

#### 1.3.3.4. Ruta Intrínseca

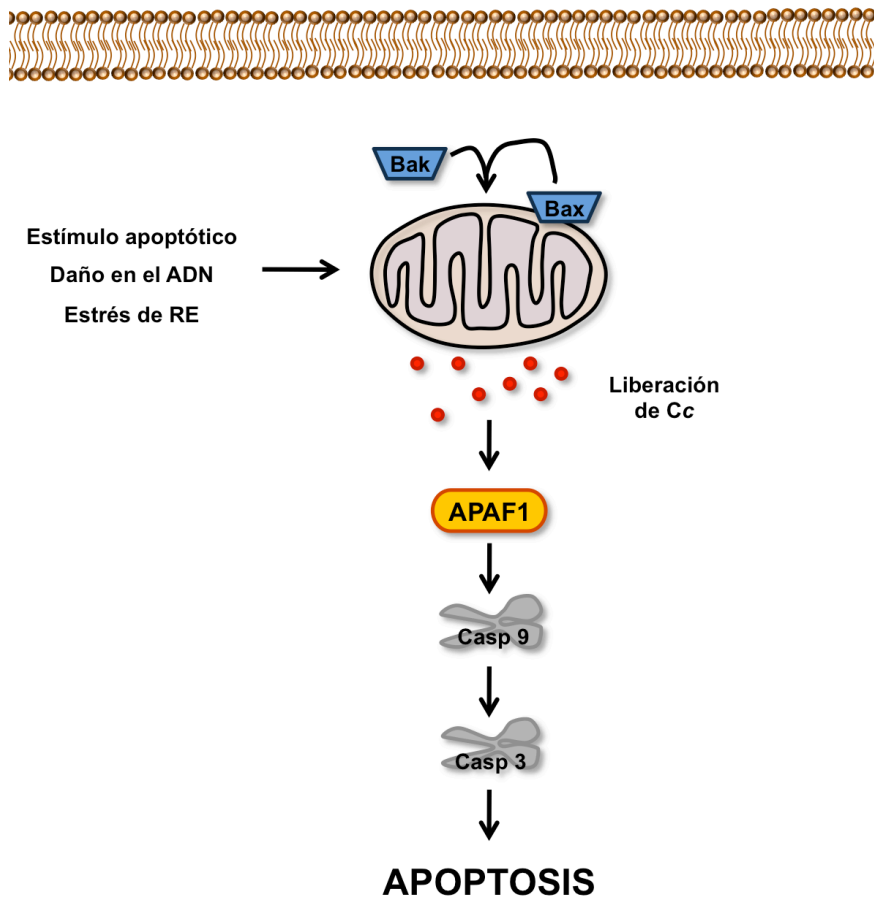
Esta ruta de señalización implica a un conjunto diverso de estímulos, no mediados por receptor, que producen señales intracelulares que actúan directamente sobre dianas en el interior celular (Elmore, 2007). Estos estímulos responsables de iniciar la cascada de señalización pueden ser tanto negativos como positivos. Entre los estímulos negativos se incluyen la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, lo que puede conducir a un fallo en la supresión de los programas de muerte celular, disparando de este modo la activación de la apoptosis. Por el contrario otros estímulos actúan de modo positivo, entre los que se incluyen la radiación, las toxinas, la hipoxia, la hipertermia, las infecciones víricas, los radicales libres, daños en el ADN, etc.

A pesar de su distinta naturaleza, todos estos estímulos, tanto negativos como positivos, comparten un aspecto en común, y es que todos ellos causan cambios en la membrana mitocondrial externa (MME), conduciendo a la apertura del denominado como poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP, del inglés *Mitochondrial Permeability Transition Pore*), a la pérdida del potencial transmembrana de la mitocondria y a la liberación al citosol de dos grandes grupos de proteínas pro-apoptóticas, que normalmente se encuentran secuestradas en el espacio intermembrana de la mitocondria (Saelens *et al.*, 2004).

El primer grupo consta de Cc, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi (Du *et al.*, 2000; van Loo *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2006). Estas proteínas activan la ruta mitocondrial dependiente de caspasas. Por ejemplo, el Cc se une a APAF1 (del inglés, **Apoptosis Protease-Activating Factor-1**), favoreciendo un cambio conformacional que induce su oligomerización dando lugar al apoptosoma, la maquinaria molecular responsable de la activación de la caspasa-9 (Zou *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2004). Por otra parte, se sabe que la función de Smac/DIABLO y HtrA2/Omi es la inhibición de la actividad de IAP (del inglés, **Inhibitor of Apoptosis Proteins**) (van Loo *et al.*, 2002; Schimmer, 2004).

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas engloba a AIF (del inglés, **Apoptosis Inducing Factor**), endonucleasa G y CAD, las cuales son liberadas de la mitocondria durante la apoptosis, siendo éste un evento tardío que ocurre una vez que la señalización apoptótica ha conducido a la célula hacia la muerte celular. AIF se transloca al interior del núcleo, donde causa la fragmentación del ADN nuclear en fragmentos cuyo tamaño oscila entre 50 y 300 kb, así como la condensación de la cromatina nuclear periférica (Joza *et al.*, 2001). Este primer evento de condensación nuclear es conocido como Fase I (Susin *et al.*, 2000). La endonucleasa G también es translocada al interior del núcleo, donde corta al ADN generando fragmentos oligonucleosomales (Li *et al.*, 2001). Tanto la endonucleasa G como AIF funcionan de forma independiente de caspasas, a diferencia de CAD, la cual es liberada desde la mitocondria y translocada al núcleo donde, tras ser procesada por la caspasa-3, conduce a la fragmentación oligonucleosomal del ADN y a una más pronunciada y avanzada condensación de la cromatina (Enari *et al.*, 1998), en un proceso que se conoce como Fase II (Susin *et al.*, 2000).

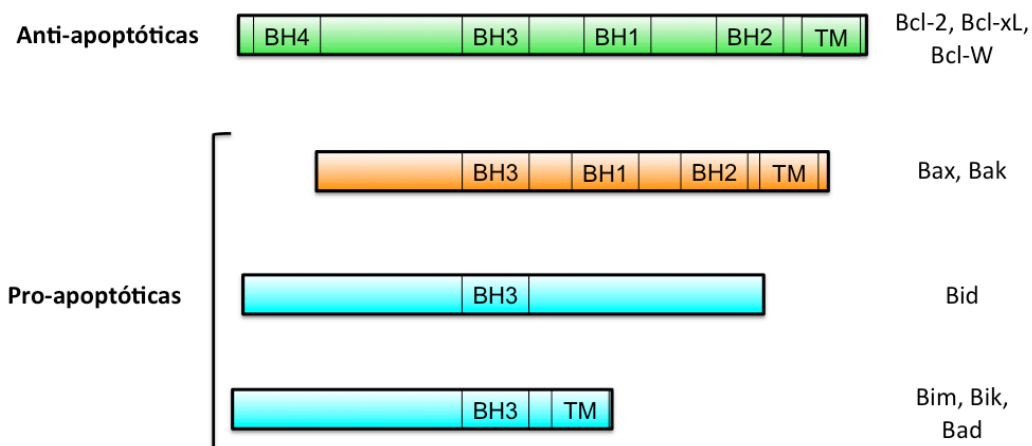
Tanto el control como la regulación de todos los eventos apoptóticos que se producen a nivel de la mitocondria dependen de los miembros de la familia Bcl-2, entre los cuales encontramos tanto miembros pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Figura 12) (Cory y Adams, 2002).



**Figura 12. Ruta intrínseca de la apoptosis.** Diferentes tipos de estímulos (daños en el ADN, estrés del RE, ausencia de factores de crecimiento, etc) actúan a nivel de la mitocondria provocando la permeabilización de la MME, mediada por Bax y Bak, lo que conduce a la liberación de factores pro-apoptóticos. Entre estos se encuentra el Cc, que provoca la activación de las caspasa y de la apoptosis.

Las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Hasta la fecha se han identificado un total de 25 genes en esta familia proteica. Entre los miembros anti-apoptóticos se incluyen Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w y BAG; mientras que entre los pro-apoptóticos encontramos a

Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas juegan un papel crucial, ya que del balance entre miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos dependerá si una célula activa el proceso de PCD o lo aborta. Se cree que el principal mecanismo de acción de las proteínas de la familia Bcl-2 es la regulación de la liberación del Cc, mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Dentro de esta familia de proteínas distinguimos tres grandes grupos, todos ellos caracterizados por la presencia de al menos un dominio BH (del inglés, *Bcl-2 Homology*). Encontramos los miembros anti-apoptóticos los cuales presentan cuatro dominios BH, los pro-apoptóticos que poseen tres de estos dominios y un tercer grupo que sólo presenta el dominio BH3 (Figura 13).



**Figura 13. Organización de los dominios de los miembros de la familia Bcl-2.** Los miembros anti-apoptóticos se caracterizan por la presencia de cuatro dominios BH (verde), mientras que en los miembros pro-apoptóticos encontramos dos grandes grupos: 1) aquellos que presentan tres dominios BH (naranja), o 2) aquellas que sólo presentan el dominio BH3 (celeste). Adaptada de Cory y Adams, 2002.

A continuación (Tabla 2) se muestra un listado de las proteínas implicadas en la regulación o ejecución de la ruta intrínseca.



Abreviatura	Nombre de la proteína	Nomenclatura alternativa
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI	None
HtrA2/Omi	High-temperature requirement	Omi stress regulated endoprotease, serine protease Omi protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins	XIAP, API3, ILP, HILP, HIAP2, cIAP1, API1, MIHB, NFR2-TRAF signaling complex protein
APAF-1	Apoptotic protease activating factor	APAF1
Caspasa 9	CysteinyI aspartic acid-protease-9	ICE-LAP6, Mch6, Apaf-3
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Programmed cell death protein 8
CAD	Caspase-Activated DNase	mitochondrial CAD, CPAN, DFF40
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2	Apoptosis regulator Bcl-2
Bcl-x	BCL2 like 1	BCL2 related protein
Bcl-XL	BCL2 related protein, long isoform	BCL2L protein, long form of Bcl-x
Bcl-XS	BCL2 related protein, short isoform	
Bcl-W	BCL2 like 2 protein	Apoptosis regulator BclW
BAG	BCL2 associated athanogene	BAG family molecular chaperone regulator
Bcl-10	B-cell lymphoma protein 10	mE10, CARMEN, CLAP, CIPER
BAX	BCL2 associated X protein	Apoptosis regulator BAX
BAK	BCL2 antagonist killer 1	BCL2L7, cell death inhibitor 1
BID	BH3 interacting domain death agonist	p22 BID
BAD	BCL2 antagonist of cell death	BCL2 binding protein, BCL2L8, BCL2 binding component 6, BBC6, Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter
BIM	BCL2 interacting protein BIM	BCL2 like 11
BIK	BCL2 interacting killer	NBK, BP4, BIP1, apoptosis inducing NBK
Blk	Bik-like killer protein	B lymphoid tyrosine kinase, p55-BLK, MGC10442
PUMA	BCL2 binding component 3	JFY1, PUMA/JFY1, p53 up-regulated modulator of apoptosis
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMA induced protein 1, APR
14-3-3	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	14-3-3 eta, theta, zeta, beta, epsilon, sigma, gamma
Aven	Cell death regulator Aven	None
Myc	Oncogene Myc	c-myc, Myc proto-oncogene protein

**Tabla 2. Proteínas implicadas en la regulación de la ruta intrínseca de la apoptosis.** En cada caso se indica la abreviatura así como el nombre de la proteína en inglés. Igualmente, se indican los nombres alternativos que existen para cada una de las proteínas. Elmore, 2007.

#### 1.3.4. Ruta de Ejecución

Tanto la ruta extrínseca como la intrínseca acaban con la activación de la fase de ejecución de la apoptosis, considerada como el acto final de este proceso, el cual comienza con la activación de las caspasas ejecutoras. Estas caspasas ejecutoras provocan la activación tanto de endonucleasas citoplásmicas, las cuales degradan el material nuclear, como de proteasas que degradan proteínas nucleares y del citoesqueleto. Concretamente, son las caspasas -3, -6 y -7 las que actúan como caspasas ejecutoras, cortando distintos sustratos, siendo por ende las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que definen a la apoptosis (Slee *et al.*, 2001).

La caspasa-3 es considerada como la más importante de las caspasas ejecutoras, siendo activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasas -8, -9 y -10). La caspasa-3 específicamente activa a la endonucleasa CAD. En células en crecimiento CAD se encuentra secuestrada por su inhibidor ICAD. En cambio, en células apoptóticas, la caspasa-3 activada corta a ICAD, liberando así a CAD (Sakahira *et al.*, 1998). Una vez liberada, CAD degrada el ADN cromosómico, causando la condensación de la cromatina. Aparte, la caspasa-3 induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos.

La gelsolina, una proteína de unión a actina, ha sido identificada como uno de los sustratos claves de la caspasa-3. Normalmente, la gelsolina actúa como núcleo de polimerización de la actina, pero al ser cortada por la caspasa-3 se produce el desmantelamiento de los filamentos de actina, afectando tanto a la división celular como a la traducción de señales (Khotakota *et al.*, 1997).

La fagocitosis de las células apoptóticas constituye la fase final de la apoptosis. La externalización de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de las células apoptóticas facilita su reconocimiento por parte de los fagocitos, impidiendo así la liberación del contenido intracelular y, por lo tanto, la aparición de una respuesta inflamatoria (Fadok *et al.*, 2001).

#### 1.4. Apoptosis en Condiciones Fisiológicas

El papel de la apoptosis es crítico durante varios procesos del desarrollo. Por ejemplo, tanto el sistema nervioso como el inmune surgen mediante una sobreproducción de células. Esta sobreproducción inicial es seguida por la apoptosis de todas aquellas células que fallan en establecer conexiones sinápticas funcionales o en producir antígenos específicos, respectivamente (Nijhawan *et al.*, 2000; Opferman y Korsmeyer, 2003).

De igual modo, la apoptosis resulta esencial para librar al cuerpo de células invadidas por patógenos, y constituye un componente indispensable en la curación de heridas, al estar implicada en la eliminación de las células inflamatorias (Greenhalgh, 1998). La apoptosis también es fundamental en la eliminación de células inmunes activadas o auto-agresivas, bien durante su maduración en los órganos linfáticos centrales o en los tejidos periféricos, impidiendo así respuestas autoinmunes (Liu *et al.*, 1996). Además, a medida que un organismo envejece, algunas células se deterioran a tasas más elevadas, por lo que es necesaria su eliminación por medio de la apoptosis.

Por lo tanto, resulta obvio que la apoptosis debe estar estrechamente regulada, ya que un defecto o un exceso en los niveles de apoptosis podrían conducir a

defectos durante el desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración o cáncer.

### **1.5. Apoptosis en Condiciones Patológicas**

La desregulación de la muerte celular constituye un componente importante de enfermedades como: el cáncer, los síndromes autoinmunes, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Huntington), etc, lo que pone de manifiesto cuan importante resulta el estudio y determinación de los mecanismos bioquímicos y genéticos implicados en el control de este proceso.

El cáncer es un ejemplo en el que los mecanismos normales de control del ciclo celular están desregulados, lo que conduce a una proliferación excesiva de células y/o a una eliminación disminuida de células (King y Cidlowski, 1998). De hecho, se cree que la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis desempeña un papel clave en el desarrollo y progresión de algunos tipos de cáncer (Kerr *et al.*, 1994), existiendo toda una variedad de mecanismos mediante los cuales las células tumorales consiguen suprimir la apoptosis.

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, o mediante la mutación o silenciamiento de proteínas pro-apoptóticas, como Bax (Elmore, 2007). Otro método usado por las células tumorales para evadir la apoptosis es mediante la elusión del sistema inmune (Smyth *et al.*, 2001). Ciertos tipos de células inmunes destruyen células tumorales mediante la ruta extrínseca o mediante la ruta perforina/granzima. Para evadir el sistema inmune, algunas células tumorales disminuyen la respuesta frente a la activación de la ruta extrínseca,

por ejemplo disminuyendo la expresión del receptor FasR, expresando formas no funcionales de éste o secretando formas solubles, de manera que FasL sea secuestrado en el medio extracelular (Cheng *et al.*, 1994; Elnemr *et al.*, 2001).

La alteración de varias rutas de señalización celular puede resultar en la desregulación de la apoptosis, conduciendo de este modo al cáncer. El supresor de tumores p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y está ampliamente mutado en cánceres humanos (Wang y Harris, 1997). El papel crítico de p53 queda al descubierto por el hecho de que se encuentra mutado en el 50 % de los cánceres humanos. Se ha descrito que p53 puede activar la reparación del ADN, puede detener el ciclo celular en el punto de regulación G1/S, y puede iniciar la apoptosis si el daño en el ADN es irreparable (Pietempol y Stewart, 2002).

Además del cáncer, una apoptosis disminuida puede conducir a enfermedades como el síndrome linfoproliferativo autoinmune (SLPA) (Woth *et al.*, 2006). Esto sucede cuando existe una apoptosis insuficiente de células T auto-agresivas, resultando en múltiples enfermedades autoinmunes. También se produce un exceso de células B, resultando en un incremento en la producción de inmunoglobulina, lo que conduce a la autoinmunidad. Algunas de las enfermedades comunes al SLPA incluyen la anemia hemolítica, la trombocitopenia inmune y la neutropenia autoinmune.

De modo similar, un exceso en los niveles de apoptosis también tiene consecuencias patológicas, tales como enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, etc. El SIDA es un ejemplo de enfermedad autoinmune, consecuencia de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Li *et al.*, 1995). Este virus infecta a las células T CD4+ a través del receptor

CD4. Posteriormente, el virus es internalizado en la célula T, donde se cree que la proteína Tat del VIH aumenta la expresión del receptor FasR, resultando en una excesiva apoptosis de células T.

La enfermedad de Alzheimer es un síndrome neurodegenerativo que se piensa que es causado por mutaciones en ciertas proteínas, como el precursor de la proteína amiloide (PPA) y las presenilinas. Las presenilinas parecen ser las responsables del procesamiento de PPA en  $\beta$ -amiloide. La formación de depósitos extracelulares de  $\beta$ -amiloide, los cuales son neurotóxicos, pueden inducir apoptosis mediante estrés oxidativo, o al provocar un aumento en la expresión del ligando FasL. También podría estar implicado en la activación de la microglía, lo cual conllevaría la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  y la activación de  $\text{TNFR1}$ , provocando apoptosis (Ethell y Buhler, 2003).

Una apoptosis excesiva parece también desempeñar un papel importante en varios daños asociados a isquemia. Un ejemplo de esto es la isquemia de miocardio causada por un fallo en el suministro de sangre, lo que conduce a una disminución en el suministro de oxígeno y, por lo tanto, a la muerte de los cardiomiocitos. Aunque durante este fenómeno lo que se produce es necrosis, se ha detectado la sobreexpresión de Bax en tejido de miocardio isquémico. Igualmente se ha comprobado como las terapias destinadas a reducir la apoptosis han mostrado cierto grado de éxito en la reducción del daño tisular (Hochhauser *et al.*, 2003). Una hipótesis es que el daño producido por la isquemia es capaz de provocar la activación de un proceso apoptótico, pero si la isquemia se mantiene de forma prolongada en el tiempo, se produce necrosis.

## 1.6. Citocromo c: Una Proteína Bifuncional

Inicialmente descubiertos por MacMunn en 1886 y, posteriormente, redescubiertos en 1925 por Keilin, los citocromos de tipo *c* se encuentran entre las proteínas más ampliamente estudiadas. Los citocromos de tipo *c* se caracterizan por su capacidad de unir de forma covalente uno o varios grupos hemo, mediante dos enlaces tioéter a través de los grupos tiol de dos residuos de cisteína (Bertini *et al.*, 2006).

El Cc mitocondrial es un citocromo de tipo *c*, caracterizado por un plegamiento conservado y por la presencia de un único sitio de unión a hemo (Cys-X-X-Cys-His). Se trata de una hemoproteína de pequeño tamaño, que se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución (Figura 14 y 15).

```

C. elegans cyc-2.1      ----MSD-----IPAGDYEKGGKVKYKQRCLQCHVVDS-TATKTGPTLHG 39
C. elegans cyc-2.2      MGKKKSDTASGGAIPGDNKGGKIFKQRCQCHVVNS-LQTKTGPTLNG 49
A. thaliana             ----MASFD---EAPPGNPKAGEKIFRTKCAQCHTVEKGAGHKQGPNLNG 43
Z. mays                 ----MAFS---EAPPGNPKAGEKIFKTCAQCHTVEKGAGHKQGPNLNG 43
H. sapiens              -----MGDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
P. troglodytes          -----MGDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
E. caballus             -----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
B. taurus               -----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
C. lupus familiaris     -----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
R. novergicus           -----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
G. gallus               -----MGDIEKGKKIFVQKCSQCHTVEKGKHKGTGPNLHG 35
D. melanogaster Cyt-c-p -----MGVPA GDVEKGKKLFVQRCQCHTVEAGGKHKVGPNLHG 39
D. melanogaster Cyt-c-d -----MGSGDAENGKKIFVQKCAQCHTVEVGKHKVGPNLGG 37
S. pombe                 -----MPYAPGDEKKGASLFKTRCAQCHTVEKGANKVGPNLHG 39
S. cerevisiae           -----MPAPYKPGSEKKGATLFKTRCLQCHTTEKGGPHKVGPNLHG 41
                        * . : * . : : : * * * . : * * * . *

```

```

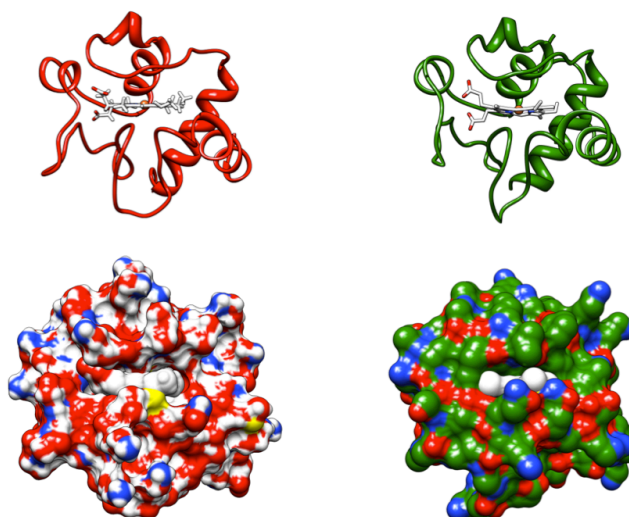
C. elegans cyc-2.1      VIGRTSGTVSGFDYSAANKNGVWVTRTLEFYLLNPKKYIPGTMVFAG 89
C. elegans cyc-2.2      VIGRQSGQVAGFDYSAANKNGVWVDRQTLFDYLADPKKYIPGTMVFAG 99
A. thaliana             LFGRQSGTTPGYSYSAANKSMAVNWEKTLFYLLNPKKYIPGTMVFPG 93
Z. mays                 LFGRQSGTTPGYSYSAAGNKNKAVIWEENTLYDYLLNPKKYIPGTMVFPG 93
H. sapiens              LFGRKTGQAPGYSYTAANKNGI IWGEDTLMEYLENPKKYIPGTMKIFVG 85
P. troglodytes          LFGRKTGQAPGYSYTAANKNGI IW-----NPKKYIPGTMKIFVG 75
E. caballus             LFGRKTGQAPGFSYTDANKNGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTMKIFAG 85
B. taurus               LFGRKTGQAPGFSYTDANKNGITWGEETLMEYLENPKKYIPGTMKIFAG 85
C. lupus familiaris     LFGRKTGQAPGFSYTDANKNGITWGEETLMEYLENPKKYIPGTMKIFAG 85
R. novergicus           LFGRKTGQAAGFSYTDANKNGITWGEDTLMEYLENPKKYIPGTMKIFAG 85
G. gallus               LFGRKTGQAEGFSYTDANKNGITWGEDTLMEYLENPKKYIPGTMKIFAG 85
D. melanogaster Cyt-c-p LIGRKTGQAAGFAYTDANKAKGITWNEDTLFEYLENPKKYIPGTMKIFAG 89
D. melanogaster Cyt-c-d VVGRKCGTAAGYKYTDANIKKGVTWTEGNLDEYLDPKKYIPGTMVFAG 87
S. pombe                 VFGRKTGQAEGFSYTEANRDKGITWDEETLFAYLENPKKYIPGTMKIFAG 89
S. cerevisiae           VFSRQSGQVSGYSYTDAMINNVTWDAQSMSDYLENPKKYIPGTMKIFAG 91
                        : . . * * . * : * : . : * : * * * * * *

```

<i>C. elegans</i> cyc-2.1	LKKADERADLIKYIEVESAKSL--	111
<i>C. elegans</i> cyc-2.2	LKKADERADLIKFIIVEAAKKPSA	123
<i>A. thaliana</i>	LKKPQDRADLIAYLKEGTA-----	112
<i>Z. mays</i>	LKKPQERADLIAYLKEATA-----	112
<i>H. sapiens</i>	IKKKEERADLIAYLKKATNE----	105
<i>P. troglodytes</i>	IKKKEERADLIAYLKKATNE----	95
<i>E. caballus</i>	IKKKTEREDLIAYLKKATNE----	105
<i>B. taurus</i>	IKKKGEREDLIAYLKKATNE----	105
<i>C. lupus familiaris</i>	IKKTGERADLIAYLKKATKE----	105
<i>R. norvegicus</i>	IKKKGERADLIAYLKKATNE----	105
<i>G. gallus</i>	IKKKSERVDLIAYLKDATSK-----	105
<i>D. melanogaster</i> Cyt-c-p	LKKPNERGDLIAYLKSATK-----	108
<i>D. melanogaster</i> Cyt-c-d	LKKAEERADLI AFLKSNK-----	105
<i>S. pombe</i>	FKKPADRN NVITYLKKATSE----	109
<i>S. cerevisiae</i>	LKKEKDRNDLITY-----	104
	: ** : * : : * :	

**Figura 14. Alineamiento de las secuencias del Cc respiratorio de diferentes organismos.**

Para ello se empleó el servidor ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).



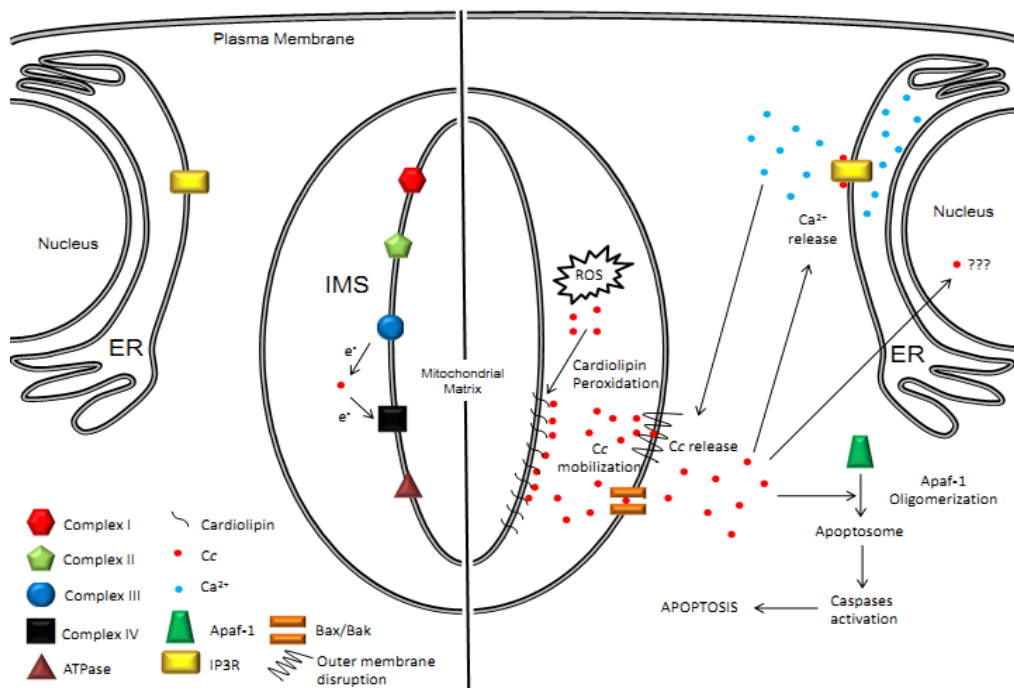
**Figura 15. Comparación estructural del Cc.** Cc humano (PDB: 1j3s) a la izquierda y de *A. thaliana* (modelo de homología usando el programa MODELLER (<http://salilab.org/modeller/>)) a la derecha. Se muestra la estructura de la cadena polipeptídica (arriba) y la superficie (abajo) de ambos citocromos.

El Cc mitocondrial es una proteína de 12 kDa, codificada a nivel del ADN nuclear. Presenta estructura globular con cuatro hélices  $\alpha$ . El grupo hemo se localiza insertado en un bolsillo en la estructura terciaria, estando parcialmente expuesto al solvente (Figura 15) y, por lo tanto, accesible para la transferencia de electrones.

El Cc es una proteína que ha sufrido pocos cambios a lo largo de la evolución (Figura 14), estando su secuencia tremendamente conservada incluso entre



organismos muy separados filogenéticamente (Fitch, 1975; Moore y Pettigrew, 1990). Además de los cuatro aminoácidos que actúan como ligandos del grupo hemo (dos cisteínas, una metionina y una histidina), el Cc mitocondrial se suele caracterizar por presentar un elevado punto isoelectrico (pI), como consecuencia de la presencia en su secuencia de un elevado número de residuos positivos, principalmente residuos de lisina.



**Figura 16. Doble papel del Cc en mamíferos.** En condiciones homeostáticas el Cc se encuentra transfiriendo electrones entre el complejo III y el complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En cambio, bajo condiciones apoptóticas (por ej. ROS), el Cc es liberado en el citoplasma, donde: 1) interacciona con APAF1, activando a las caspasas y promoviendo la apoptosis, 2) interacciona con el receptor de inositol tri-fosfato (IP3R), induciendo la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el RE hacia el citoplasma, y 3) es translocado al interior del núcleo, aunque la función que desempeña en el núcleo aún permanece por determinar. Martínez-Fábregas *et al.*, 2011.

En condiciones homeostáticas la función del Cc mitocondrial es esencialmente el tráfico de electrones entre los complejos respiratorios citocromo *bc<sub>1</sub>* y citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, pero en el caso de

células de vertebrados esta pequeña proteína también se encuentra implicada en la activación de la apoptosis (Jiang y Wang, 2004) (Figura 16).

La demostración del papel del Cc en la activación de la apoptosis fue realizada en 1996. Concretamente, el laboratorio de Xiadong Wang consiguió llevar a cabo *in vitro* el estudio del proceso de activación de las caspasas (Liu *et al.*, 1996). Este grupo determinó que la adición de dATP inducía la activación de la caspasa-3 en extractos citosólicos de células HeLa. Este ensayo permitió identificar al Cc como la primera proteína requerida para la activación mediada por dATP de la caspasa-3. Posteriormente, se consiguió identificar a APAF1 y la caspasa-9 como los otros dos componentes implicados en la activación de la caspasa-3.

Inicialmente, la implicación del Cc en la activación de la apoptosis estuvo en entredicho, ya que se trata de una proteína esencial en la producción de energía, que además se localiza en el interior de la mitocondria. Sin embargo este papel central del Cc en la apoptosis fue rápidamente confirmado, gracias a la identificación de APAF1 (Zou *et al.*, 1997) y a la demostración de que Bcl-2 inhibía la muerte celular previniendo la liberación del Cc desde la mitocondria (Yang *et al.*, 1997).

El papel del Cc en la activación de la apoptosis sólo ha sido establecido en el caso de mamíferos. Aunque resulta interesante tener en cuenta que la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol ha sido descrita en una enorme variedad de organismos, como levaduras (Giannattasio *et al.*, 2008), plantas (Balk *et al.*, 1999; García-Heredia *et al.*, 2008), moscas (Arama *et al.*, 2006) y mamíferos (Liu *et al.*, 1996).

Resulta intrigante la propuesta de que en torno al 90 % del Cc de la mitocondria se localiza secuestrado en el interior de las crestas mitocondriales y, por lo tanto, no disponible para el transporte electrónico (Delivani y Martin, 2006). Por otra parte, la interacción del Cc con APAF1 ocurre aguas arriba en la cascada de señalización, provocando la activación de las caspasas iniciadoras que activan a las caspasas efectoras, amplificando así la señal, de modo que a priori la cantidad de Cc necesaria debería de ser pequeña. Teniendo en cuenta ambos aspectos, la concentración de Cc en el espacio intermembrana de la mitocondria (0,5-5 mM, Forman y Azzi, 1997) es extremadamente alta, por lo que surge la pregunta acerca de si el Cc podría estar implicado de algún modo en la regulación de otros procesos durante la PCD.

Aparte de esta función bien establecida *in vitro* del Cc durante la apoptosis en mamíferos, recientemente se han propuesto nuevas posibles funciones para el Cc durante la apoptosis. Mientras que algunos grupos sugieren que el Cc participa exclusivamente en la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas (Solary *et al.*, 2008), otros grupos han propuesto recientemente la translocación del Cc durante la apoptosis al núcleo (Nur-E-Kamal *et al.*, 2004) y al retículo endoplásmico (Boehning *et al.*, 2005), lo que abre la posibilidad a la existencia de nuevas funciones del Cc durante la apoptosis, aún no exploradas. La función desempeñada *in vivo* por los componentes conocidos de la ruta de señalización apoptótica – proteínas de la familia Bcl-2, caspasas, APAF1, etc. – ha sido determinada mediante análisis genéticos (Elmore, 2007). Sin embargo, esta misma aproximación no ha podido ser ampliamente aplicada en el caso del Cc, debido a su papel esencial en la respiración mitocondrial, con la

excepción de dos trabajos que conducen a resultados contradictorios (Li *et al.*, 2000; Vempati *et al.*, 2007). En el año 2000, Li y colaboradores obtuvieron una línea celular mutante *knockout* para el Cc que mostraba resistencia a inductores de la ruta intrínseca, pero también una mayor sensibilidad a inductores de la ruta extrínseca. Sin embargo, Vempati y colaboradores demostraron, posteriormente, que la línea celular desarrollada por Li y colaboradores estaba expresando una isoforma testicular del Cc. Eliminando ambas isoformas del Cc observaron que la línea era resistente a ambos tipos de inductores, tanto de la ruta intrínseca como de la ruta extrínseca. Teniendo en cuenta el fenotipo del mutante *knockout* de Cc desarrollado por Vempati y colaboradores, resulta llamativo que en mutantes *knockout* de APAF1 la apoptosis transcurre normalmente, siendo APAF1 la única proteína con la que se ha descrito que el Cc interacciona durante la muerte celular (Marsden *et al.*, 2002; Shawgo *et al.*, 2009).

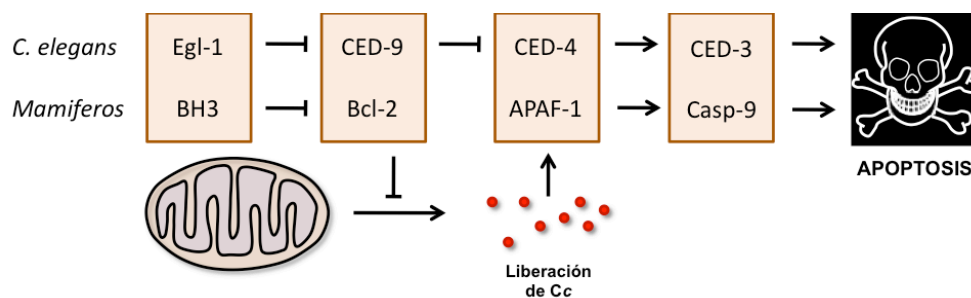
## **1.7. PCD en otros Organismos. Una Mirada Evolutiva**

### **1.7.1. *Caenorhabditis elegans***

El concepto de suicidio celular fisiológico fue demostrado a nivel molecular por Horvitz y colaboradores (Horvitz, 1999), al demostrar que en *C. elegans* existe una ruta de señalización que controla la muerte celular de un grupo específico de neuronas durante el desarrollo, en la que encontramos reguladores tanto positivos como negativos (Hengartner, 1999; Horvitz, 1999; Liu y Hengartner, 1999).

En el caso de *C. elegans* la PCD es llevada a cabo por la caspasa CED-3. De forma similar a lo que sucede con todas las caspasas conocidas, CED-3 es

sintetizada como un zimógeno inactivo y su maduración implica un procesamiento autocatalítico. La autoactivación de CED-3 depende de la proteína adaptadora CED-4. En respuesta a un estímulo de muerte celular, CED-4 es liberada de un complejo inactivo formado por un homodímero asimétrico de CED-4 y una molécula de la proteína anti-PCD CED-9 (Yan *et al.*, 2004, 2005). Una vez liberada, CED-4 oligomeriza dando lugar a un complejo macromolecular, conocido como apoptosoma CED-4, el cuál recluta a CED-3, facilitando su activación autocatalítica (Yang *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2006). En la figura 17 se muestra una comparación de la ruta que controla la PCD en *C. elegans* y mamíferos.

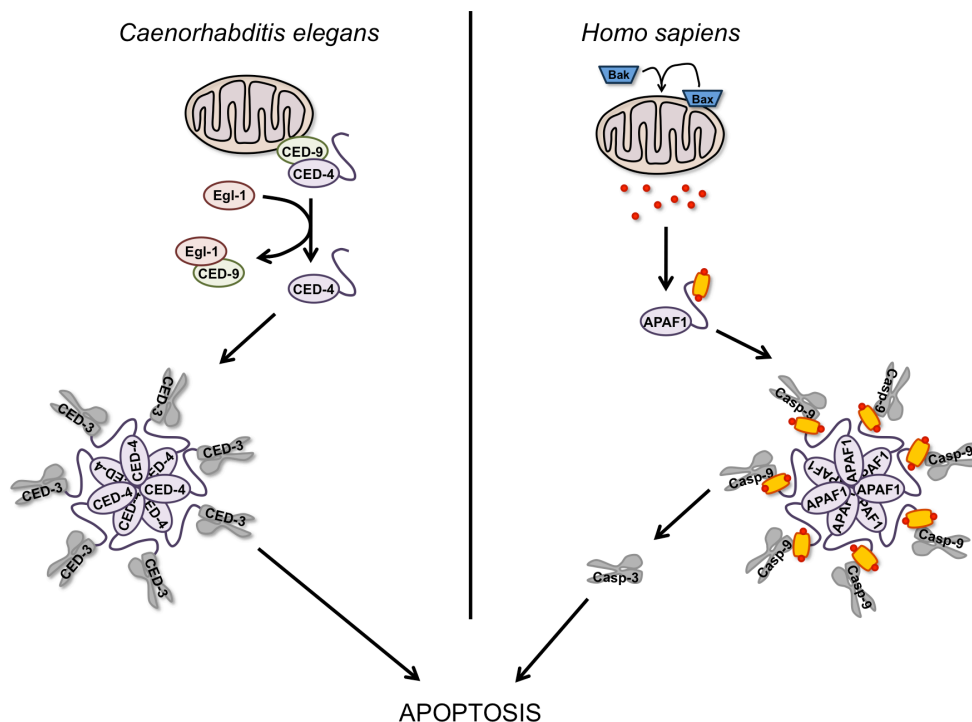


**Figura 17. Comparación de la ruta de señalización apoptótica en *C. elegans* y mamíferos.**

En el caso de *C. elegans* un estímulo pro-apoptótico provoca la activación de Egl-1, que inhibe a CED-9, liberando a CED-4, que permite la activación de CED-3 y la activación de la respuesta apoptótica. En el caso de mamíferos, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 inhiben a los anti-apoptóticos, permitiendo la salida de Cc y la activación de la apoptosis. Adaptada de Jiang y Wang, 2001.

La proteína de mamíferos APAF1 es un homólogo de CED-4 (Zou *et al.*, 1997), compartiendo ambas una serie de características. Ambas proteínas presentan un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, del inglés **Caspase Recruitment Domain**) en el extremo N-terminal, seguido de un motivo  $\alpha/\beta$  de unión de nucleótidos, un dominio helicoidal pequeño (HD1), un dominio WHD y

un segundo dominio helicoidal (HD2) (Qi *et al.*, 2010). CED-4, de modo similar a APAF1, oligomeriza y recluta a CED-3, homólogo a la caspasa-9 de mamíferos, mediando su activación autocatalítica. Pero a diferencia del apoptosoma de mamíferos, en el cual la presencia del Cc está bien descrita, en el caso de *C. elegans* el Cc no forma parte del apoptosoma, tal y como queda demostrado en la estructura del apoptosoma de *C. elegans* recientemente publicada (Qi *et al.*, 2010). La figura 18 muestra una comparación del proceso de oligomerización de APAF1 o CED-4, para la activación de la caspasa iniciadora.

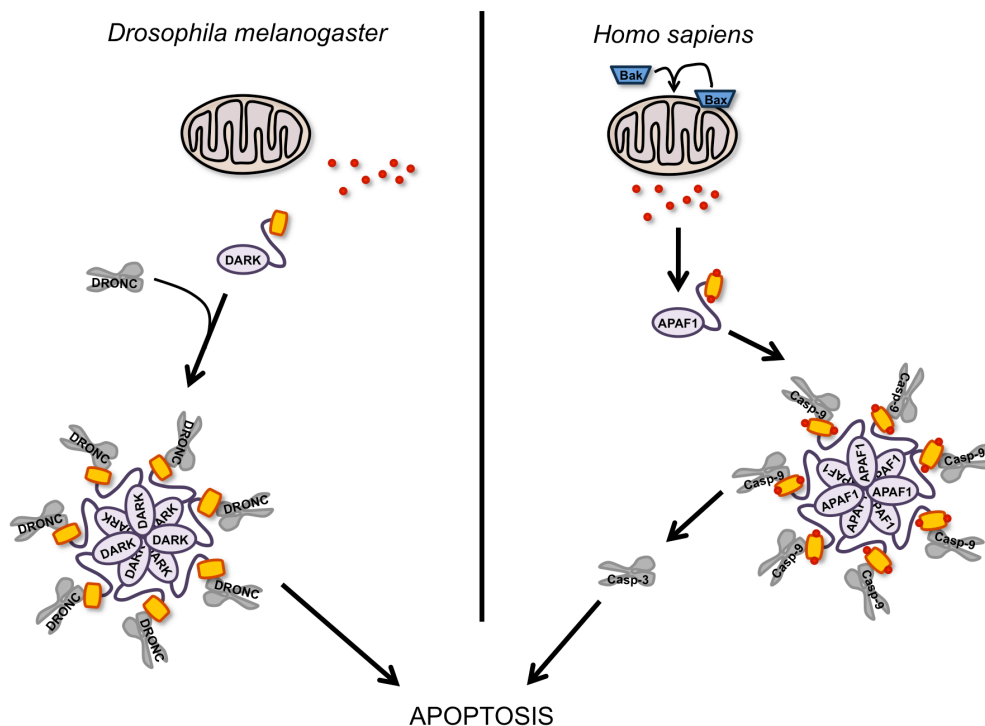


**Figura 18. Comparación de la ruta de activación del apoptosoma CED-4 (*C. elegans*) y APAF1 (*H. sapiens*).** En el caso de *C. elegans* en condiciones apoptóticas, Egl-1 secuestra a CED-9, permitiendo así la liberación y oligomerización de CED-4, la cual recluta y activa a la proteasa CED-3, lo que conduce a la apoptosis. En el caso de *H. sapiens*, el Cc una vez en el citoplasma, interacciona con APAF1, promoviendo su oligomerización, dando lugar al apoptosoma, el cual recluta y activa a la caspasa-9, la cual activa a la caspasa-3, lo que conduce a la apoptosis. Adaptada de Qi *et al.*, 2010

### 1.7.2. *Drosophila melanogaster*

En el caso de *D. melanogaster*, frente a un estímulo apoptótico se ha demostrado que la proteína DARK (del inglés, ***Drosophila APAF1 Related Killer***) sufre un proceso de oligomerización, de forma independiente de la actuación del Cc, dando lugar a un apoptosoma que actúa en la ruta intrínseca de muerte celular. Este complejo, al igual que sucede en mamíferos o *C. elegans*, es esencial para la mayor parte de los procesos de muerte celular que acontecen durante el desarrollo y para la apoptosis inducida por estrés (Kanuka *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2007). Es interesante tener en cuenta que, desde un punto de vista estructural, DARK comparte las mismas características anteriormente expuestas para APAF1 y CED-4, pero a diferencia de CED-4 ambas proteínas, DARK y APAF1, presentan las repeticiones WD40 (Yu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2010), las cuales en el caso de APAF1 son las responsables de su interacción con el Cc.

Durante la apoptosis en el caso de *D. melanogaster*, tras la oligomerización de Dark, la caspasa iniciadora Dronc se une al apoptosoma Dark mediante interacciones a través de sus dominios CARD-CARD (Dorstyn *et al.*, 1999). Esta interacción supone un cambio conformacional en la pro-caspasa DRONC, que provoca su autoprocesamiento y, por lo tanto, su autoactivación, lo que le permite poder activar a la caspasa ejecutora DrICE, de modo que se produce la activación de una cascada proteolítica que finaliza con la muerte celular, de modo similar a lo que se produce tanto en *C. elegans* como en mamíferos (Figura 19).



**Figura 19. Comparación de la ruta de activación del apoptosoma DARK (*D. melanogaster*) y APAF1 (*H. sapiens*).** En el caso de *D. melanogaster*, en condiciones apoptóticas se produce la oligomerización de DARK, lo cual parece independiente de Cc, dando lugar al apoptosoma que recluta a la proteasa DRONC, lo que conduce a la apoptosis. En el caso de *H. sapiens*, el Cc una vez en el citoplasma interacciona con APAF1, promoviendo su oligomerización, dando lugar al apoptosoma, el cual recluta y activa a la caspasa-9, que activa a la caspasa-3, lo que conduce a la apoptosis. Adaptada de Riedl y Shi, 2004.

Inicialmente, se pensó que el Cc podría estar implicado en el ensamblaje de DARK o en la activación de DRONC, pero datos más recientes sugieren que el Cc no es requerido para ninguno de estos fenómenos (Dorstyn *et al.*, 2002; Dorstyn *et al.*, 2004; Dorstyn y Kumar, 2008; Yu *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que el Cc es necesario para la apoptosis en *D. melanogaster*, al menos en algunos tejidos específicos (Kornbluth y White, 2005; Mendes *et al.*, 2006).



A pesar de todo lo expuesto anteriormente, recientemente se ha publicado que un mutante *knockout* para el Cc distal de *D. melanogaster* manifiesta un profundo retraso de la apoptosis, lo que sugiere la existencia de un papel alternativo para el Cc en el desarrollo de la apoptosis en este organismo modelo (Arama *et al.*, 2006).

### 1.7.3. Plantas Superiores

La PCD es un fenómeno fundamental tanto en plantas como en animales (Greenberg, 1996; Gilbert, 2001; Vianello *et al.*, 2007). En el caso de plantas la PCD se encuentra implicada en un gran número de eventos esenciales durante el desarrollo, concretamente en la formación del xilema, la formación de la madera en árboles y plantas perennes, la abscisión de las hojas, la auto-incompatibilidad y la respuesta de defensa a una gran variedad de patógenos y estreses de origen ambiental.

Las investigaciones han permitido poner de manifiesto una serie de similitudes entre la PCD de animales y de plantas (Vianello *et al.*, 2007) (Tabla 3). Por ejemplo, la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol es un evento clave de la apoptosis en mamíferos que también sucede en plantas (Balk *et al.*, 1999; Balk y Leaver, 2001).

La implicación de la mitocondria en la PCD en plantas ha sido sugerida por diversos autores (Jones, 2000), y relacionada con la respuesta hipersensible (Lam *et al.*, 2001). Aún así, los mecanismos de activación de la apoptosis que se han descrito en el caso de mamíferos no han podido ser verificados en plantas, debido a que en este caso la evidencia experimental es limitada y, en ocasiones, contradictoria.

	Animales	Plantas
Encogimiento celular	+	+
Cuerpos apoptóticos	+	-
Condensación de la cromatina	+	+
Fragmentación nuclear	+	+/-
Incremento del volumen mitocondrial	+/-	+/-
Disipación del potencial de membrana mitocondrial	+	+
Alto nivel de ATP	+	+/-
Proteínas pro-apoptóticas	Familia Bcl2	Tipo Bax?
Liberación de Cc	+	+/-
Liberación de endonucleasas	+	+
Caspasas	+	Metacaspasas
Enzimas de procesamiento vacuolar	-	+
Apoptosoma	+	-

**Tabla 3. Apoptosis animal *versus* PCD vegetal.** Comparación de los principales eventos que se producen durante la apoptosis animal y la PCD vegetal. Adaptada de Vianello *et al.*, 2007.

### 1.7.3.1 Liberación de Citocromo c

La señal más comúnmente utilizada para identificar a la mitocondria de plantas como un ejecutor de la PCD es la liberación de Cc. La primera evidencia de esta implicación fue proporcionada por Zhao y colaboradores (Zhao *et al.*, 1999), los cuales demostraron que la adición de Cc a extractos citoplásmicos de zanahoria inducía la degradación del ADN en núcleos purificados de ratón, la cual era prevenida al añadir inhibidores de caspasas. Posteriormente, la liberación de Cc en condiciones de PCD ha sido descrita en múltiples sistemas vegetales (Stein y Hansen, 1999; Hansen, 2000; García-Heredia *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que la respuesta hipersensible inducida por harpina se encuentra asociada con una alteración de las funciones mitocondriales (Xie y Chen, 2000). Además, los pasos iniciales de la PCD en

plantas son estrés oxidativo, consumo de ATP, colapso del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de Cc.

#### **1.7.3.2. Liberación de Endonucleasas**

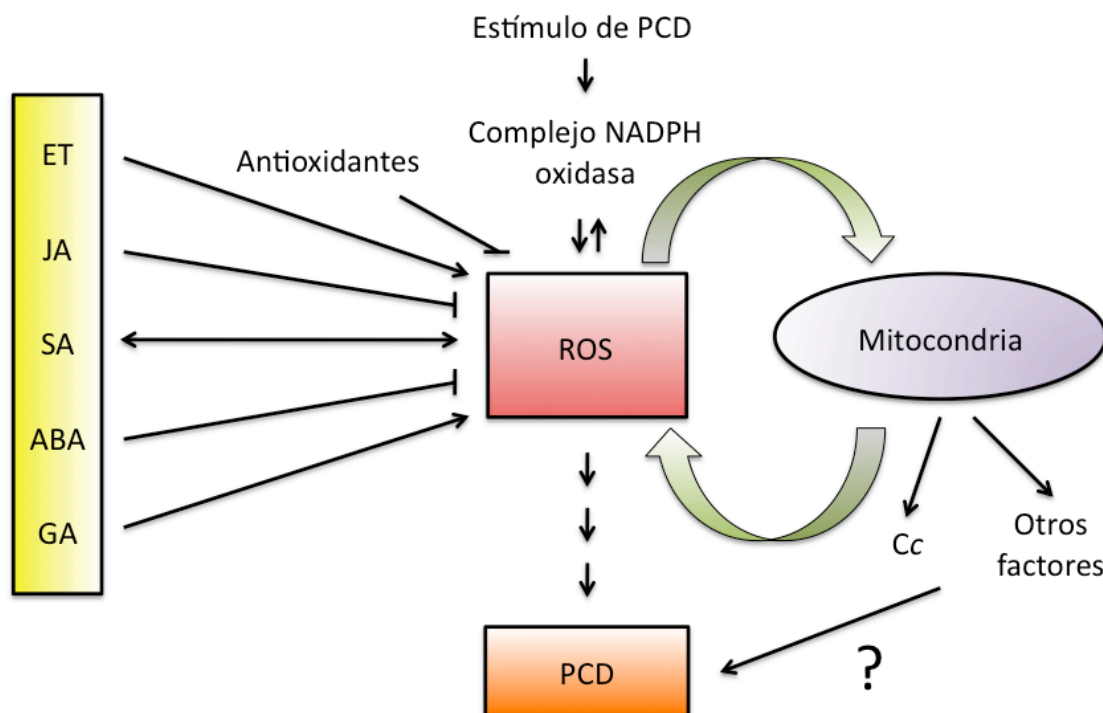
En varios sistemas vegetales se ha podido demostrar que durante la PCD se produce la activación de diferentes ADNasas y la sobreexpresión de genes de nucleasas (Sugiyama *et al.*, 2000). Aunque la mayoría de la evidencia experimental muestra que la liberación del Cc está asociada con la fragmentación del ADN, la inducción de la actividad de endonucleasas durante la PCD sólo ha sido descrita en algunos casos (Stein y Hansen, 1999; Balk *et al.*, 2003).

#### **1.7.3.3. Papel de la Mitocondria en la PCD Vegetal**

La regulación de la apoptosis de mamíferos está bajo el control de miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, algunos de los cuales están localizados en la mitocondria (Kaufmann y Hengartner, 2001). Sin embargo, resulta problemático extender este mecanismo a la PCD de plantas. La única evidencia experimental está asociada con la observación de que la expresión heteróloga de proteínas pro-apoptóticas de mamíferos (Bax) causa PCD en *A. thaliana*, mediante un mecanismo que puede ser reprimido mediante la sobreexpresión del inhibidor 1 de Bax (BI-1) (Bolduc y Brisson, 2002; Kawai-Yamada *et al.*, 2004).

Sin embargo, aparte de las posibles similitudes que la PCD vegetal presenta con la apoptosis animal, lo que está claro es que existen numerosos

reguladores de PCD específicos de plantas, entre los que se encuentran las principales hormonas vegetales (Hoeberichts y Woltering, 2002) (Figura 20).



**Figura 20. Modelo de la ruta de señalización de PCD en plantas.** Ante un estímulo de PCD, se produce un aumento en los niveles de ROS, sobre el cual actúan los antioxidantes de forma negativa, pero también las hormonas vegetales, tanto de forma negativa (ácido pasmónico (JA) o ácido abscísico (ABA)) como de forma positiva (etileno (ET), ácido salicílico (SA) o las giberelinas (GA)). El aumento de ROS conduce a la PCD, aunque también señala a nivel de la mitocondria promoviendo la liberación de Cc, aunque el papel que desempeña el Cc en el desarrollo de la PCD aún permanece por esclarecer. Adaptada de Hoeberichts y Woltering, 2002.

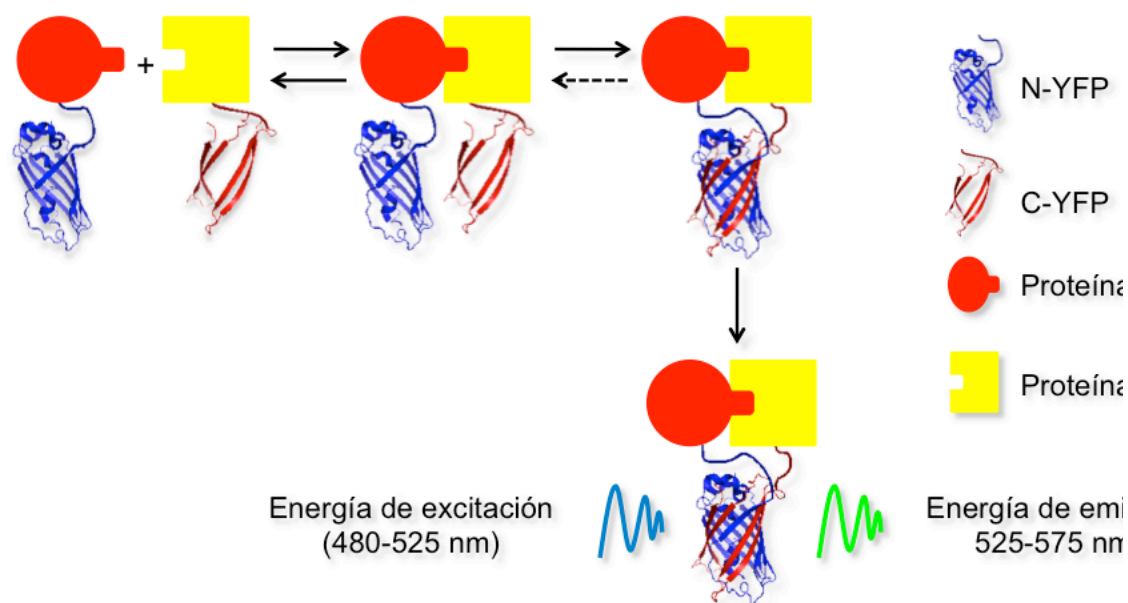
En el caso de la PCD vegetal parece que la señalización mediante especies reactivas de oxígeno (ROS) directa o indirectamente interacciona con otras rutas de señalización celular basadas en hormonas, tales como el ácido salicílico, el ácido jasmónico o el etileno, siendo la interacción y el balance entre todos estos procesos lo que determina si una célula vegetal vive o muere (Overmeyer *et al.*, 2003).

## 1.8. Objetivos de la Tesis Doctoral

Como objetivo de la tesis, se decidió estudiar la posible conservación evolutiva del papel del Cc durante la PCD, tanto en su activación como en su progresión. Para ello se tomaron como organismos modelo *H. sapiens* y *A. thaliana*, estando en ambos casos descritos el proceso de PCD, aunque sólo en el caso de humanos ha sido descrita una función para el Cc. En el caso de mamíferos, como se explicó anteriormente, el Cc, una vez liberado de la mitocondria, induce la oligomerización junto al dATP de APAF1, permitiendo la formación del apoptosoma, encargado de la activación de las caspasas, lo que conduce a la apoptosis.

Con este objetivo se emplearon los Cc procedentes de ambos organismos para aislar sus posibles dianas en condiciones de PCD mediante cromatografía de afinidad, identificando estas dianas posteriormente mediante espectrometría de masas.

En segundo lugar se decidió estudiar la interacción de ambos Cc con sus dianas, previamente identificadas *in vitro*, para lo cual se empleó la Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC, del inglés ***Bimolecular Fluorescence Complementation***). El BiFC es una técnica basada en la reconstitución de una proteína fluorescente (por ej. YFP, del inglés, ***Yellow Fluorescent Protein***), lo que permite el estudio de la interacción entre proteínas. Para ello, las dos proteínas cuya interacción será objeto de estudio se fusionan a las dos mitades de la proteína fluorescente (por ej. C-YFP (fragmento C-terminal de la YFP) y N-YFP (fragmento N-terminal de la YFP)). Finalmente, la interacción de las dos proteínas se determina mediante la reconstitución de la proteína fluorescente (Figura 21).



**Figura 21. Esquema del funcionamiento del BiFC.** La interacción de dos proteínas, cada una de ellas fusionada a una mitad de la YFP (C-YFP o N-YFP), permite la reconstitución de la YFP, la cual emite luz a 525-575 nm al ser excitada con luz a 480-525 nm. Esto permite estudiar *in vivo* la interacción entre proteínas a través de la reconstitución de la fluorescencia de la YFP.

En tercer lugar se planteó determinar el grado de conservación del Cc, analizando para ello por medio de la técnica BiFC la capacidad del Cc humano para interactuar con las dianas identificadas para el Cc de *A. thaliana* y viceversa.

En cuarto lugar, se emplearon técnicas de DOCKING para analizar *in silico* los posibles complejos que se forman entre el Cc de *H. sapiens* y aquellas dianas cuya estructura tridimensional había sido resuelta, estando por lo tanto disponibles sus archivos de coordenadas PDB (del inglés, **Protein Data Bank**). A partir de estos modelos se pudieron diseñar mutantes con el objetivo de alterar tanto la interacción como la función.

Finalmente, se tomaron como modelos dos de las dianas del Cc de *H. sapiens*, nucleofosmina (NPM, del inglés Nucleophosmin) y parvalbumina (PVALB, del inglés Parvalbumin). En la literatura está descrita que la sobreexpresión de ambas dianas es capaz de evitar la apoptosis, por lo que se analizó si la sobreexpresión de estas dianas en conjunto con el Cc, tanto en su forma silvestre como los mutantes diseñados en base a los datos obtenidos mediante DOCKING, era capaz de devolver a las células su capacidad de responder a estímulos apoptóticos.





## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

*“It ain't what you don't know that gets you into trouble.  
It's what you know for sure that just ain't so.”  
(Mark Twain)*



## 2.1. Organismos y Condiciones de Cultivo

### 2.1.1. *Escherichia coli*

Se emplearon dos estirpes de *E. coli* durante la realización de esta tesis, DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) para mutagénesis dirigida, propagación de plásmidos y ligación, y BL-21 (DE3) (Studier y Moffatt, 1986) para la expresión de Cc respiratorio. En la Tabla 4 se muestran los genotipos de las estirpes usadas.

NOMBRE	GENOTIPO	REFERENCIA
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (87acaya-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	Hanahan, 1983
BL-21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Studier y Moffatt, 1986

**Tabla 4. Genotipo de las distintas estirpes de *E. coli* empleadas.** Distintas estirpes de *E. coli* usadas en esta tesis tanto para la expresión de proteínas (BL-21 (DE3)) como para las aproximaciones de biología molecular (DH5 $\alpha$ ).

Para el crecimiento de las distintas estirpes de *E. coli*, tanto en medio sólido como en medio líquido, se empleó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), con la siguiente composición: 10 g L<sup>-1</sup> de cloruro sódico, 10 g L<sup>-1</sup> de triptona y 5 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura. El medio LB se suplementó con 6 mg L<sup>-1</sup> de citrato de hierro-amonio (Citrato-Fe(III)-NH<sub>4</sub>) cuando fue empleado para la producción de Cc respiratorio. El medio sólido se preparó añadiendo 15 g L<sup>-1</sup> de agar al medio LB.

Los antibióticos empleados para la propagación de los plásmidos se esterilizaron mediante filtración, y se emplearon a las concentraciones finales que se indican a continuación:

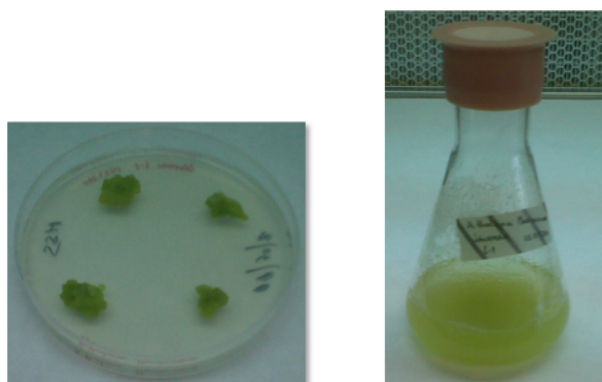
Ampicilina (Ap)	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Cloranfenicol (Cm)	12 $\mu\text{g L}^{-1}$

Las células en medio líquido se cultivaron en tubos de 10 mL, con 5 mL de medio, para la obtención de plásmidos, o en matraces Erlenmeyer de 50 mL, con 20 mL de medio, para la preparación de preinóculos para la expresión de proteínas.

Todos los medios fueron esterilizados en un autoclave (Labo Autoclave, Sanyo) a 120 °C de temperatura y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

### 2.1.2. Células de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de extractos de *A. thaliana*, tanto en condiciones homeostáticas como tras inducir PCD, se emplearon células de la línea MM2d, ecotipo Landsberg *erecta* (Bayer Bioscience N.V.), que crecen en forma de callos cuando se cultivan en medio sólido (Figura 22, izquierda). A partir de los callos se pueden obtener cultivos en suspensión mediante la escisión con bisturí de pequeños fragmentos, que se añaden al medio líquido (Figura 22, derecha).



**Figura 22.** Cultivos de células MM2d de *Arabidopsis thaliana*. Callos de de *A. thaliana* cultivados en placas de medio MS (izquierda). Matraz con células de *A. thaliana* en medio líquido (derecha).

Las células en medio líquido se cultivaron bajo iluminación continua obtenida a partir de lámparas fluorescentes de luz blanca ( $50 \mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), en un agitador a 100 rpm a 25 °C, en medio MS modificado (Murashige y Skoog, 1962), con la siguiente composición:

Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1,65	$\text{g L}^{-1}$
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6,2	$\text{mg L}^{-1}$
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	440	$\text{mg L}^{-1}$
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,025	$\text{mg L}^{-1}$
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370	$\text{mg L}^{-1}$
Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,0025	$\text{mg L}^{-1}$
Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170	$\text{mg L}^{-1}$
Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	22,3	$\text{mg L}^{-1}$
Yoduro de potasio (KI)	0,83	$\text{mg L}^{-1}$
Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,25	$\text{mg L}^{-1}$
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8,6	$\text{mg L}^{-1}$
Sacarosa	30	$\text{g L}^{-1}$
Kinetina	50	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Ácido naftalénico	500	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Cefotaxime	0,2	$\text{mg mL}^{-1}$
Penicilina	0,2	$\text{mg mL}^{-1}$
pH ajustado a 5.5		

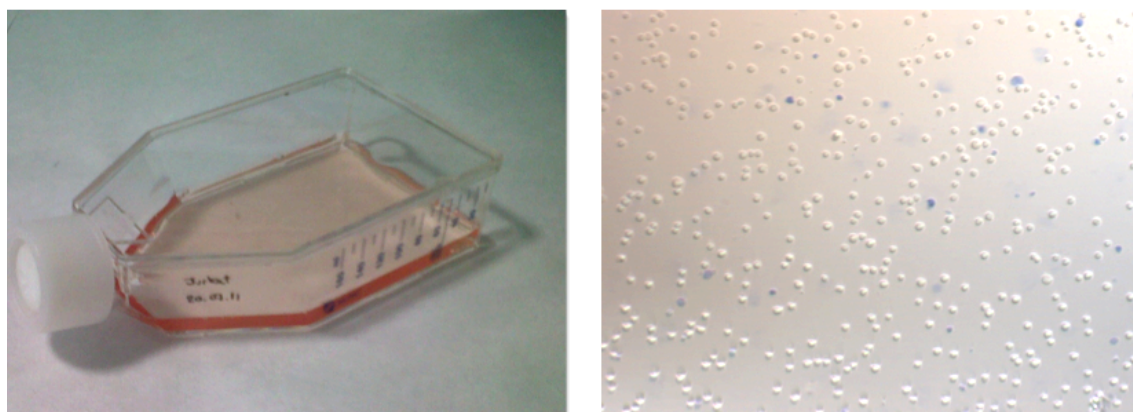
El medio MS se esterilizó en autoclave como se describió anteriormente. Por su parte, la kinetina, el ácido naftalénico, la penicilina y el cefotaxime se esterilizaron mediante filtración y fueron añadidos al medio una vez enfriado.

Los cultivos se refrescaban cada 7 días, durante la fase de crecimiento exponencial, mediante una dilución 1:10 en medio fresco. Para los experimentos se usaron cultivos con una concentración de clorofila de aproximadamente  $1,5\text{--}2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.1.3. Células de *Homo sapiens*

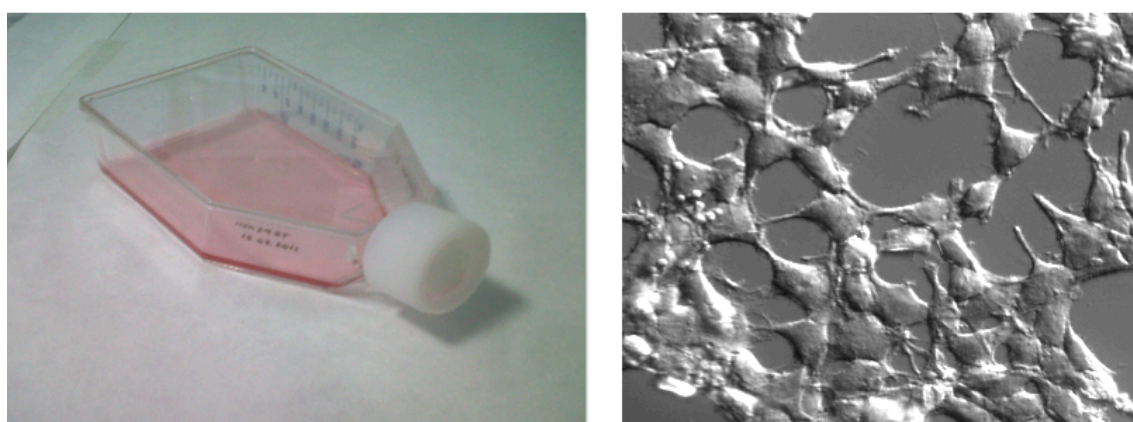
Para los experimentos de inducción de apoptosis, así como para la obtención de los extractos, tanto en condiciones homeostáticas como en condiciones apoptóticas, se usaron células humanas *Jurkat* (linfoblásticas), que crecen tanto en medio líquido como en cultivos en suspensión.

Las células *Jurkat* humanas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (PAA), suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (PAA) inactivado por calor (30 minutos a  $55\ ^\circ\text{C}$ ), L-glutamina 2 mM (GIBCO), 100 unidades  $\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina (GIBCO) y  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$  de penicilina (GIBCO), a  $37\ ^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 5 %  $\text{CO}_2$  / 95 % aire. Las células fueron crecidas exponencialmente como monocapas confluentes en frascos de 645 mL (Nunc), refrescando el medio cada 48 horas, mediante una dilución 1:10 en medio nuevo (Figura 23).



**Figura 23. Cultivo de células *Jurkat*.** Células *Jurkat* creciendo en medio líquido RPMI-1640. Frasco de cultivo (izquierda) e imagen de microscopía en campo claro (derecha).

Las células humanas embrionarias de riñón (HEK293T), empleadas para los ensayos de BiFC, fueron crecidas en medio DMEM (PAA) suplementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO), 100 unidades  $\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina (GIBCO), 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de penicilina (GIBCO) y un 10 % de suero fetal bovino (PAA) inactivado térmicamente, a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5 %  $\text{CO}_2$  / 95 % aire (Figura 24). Cuando se emplearon para microscopía de fluorescencia, las células HEK293T crecieron hasta un 80 % de confluencia en placas de 24 pocillos con 500  $\mu\text{l}$  de DMEM, conteniendo cubres de 20 mm (Figura 25).



**Figura 24. Cultivo de células HEK293T.** Células HEK293T creciendo en medio líquido DMEM. Frasco de cultivo (izquierda) e imagen de microscopía en campo claro (derecha).



**Figura 25. Cultivo de células HEK293T para experimentos de microscopía.** Placas de 24 pocillos empleadas para el crecimiento de células HEK293T para la realización de experimentos de microscopía.

#### **2.1.4. Métodos para la Recolección de Células**

Las células de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación en una centrífuga preparativa refrigerada (Avanti J-25, Beckman-Coulter) a 20.000 g durante 2 minutos, o bien en una microcentrífuga Eppendorf a 13.000 g durante 3 minutos, en función del volumen de cultivo.

Las células humanas se recogieron también mediante centrifugación, pero en este caso a 1.500 g durante 2 minutos, mientras que las células de *A. thaliana* se recogieron a 2.000 g durante 5 minutos, utilizando en estos casos una centrífuga de mesa (Megafuge 1.0, Heraeus) para tubos de 15 y 50 mL.

## **2.2. Métodos de Biología Molecular**

### **2.2.1. Aislamiento de ADN Plasmídico**

El aislamiento de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), usando para ello el sistema comercial



“FastPlasmid Mini Kit” (Eppendorf) o “FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit” (FAVORGEN) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### 2.2.2. Transformación de Células de *Escherichia coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* fue realizada por el Servicio de Cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF) según el método descrito en 1985 por Hanahan.

Las células competentes transformables por medio de choque térmico (por ej. DH5 $\alpha$ ) se transformaron incubando el ADN plasmídico con una alícuota de células competentes previamente descongeladas en hielo. Tras 15 minutos de incubación en hielo, la suspensión celular se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 100 segundos, incubándose nuevamente a temperatura ambiente durante 6 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de LB a la suspensión celular, incubándose durante 30 minutos a 37 °C. Por último las células se sembraron en placas de medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes, recogiendo las placas a las 16 horas de incubación.

Cuando se emplearon células transformables por electroporación (por ej. BL-21 (DE3)), el ADN transformante se mezcló con una alícuota de células competentes descongeladas de la misma manera. Posteriormente, la suspensión de ADN y células se sometió a una descarga eléctrica de 2.500 V, tras lo que se añadió 1 mL de LB sin antibióticos, incubando las células durante 1 hora a 37 °C, para permitir la expresión del gen de resistencia. Finalmente, las células se inocularon en matraces con 10-50 mL de LB suplementado con

los antibióticos apropiados, dejándolas crecer durante 16 horas a 37 °C y 150 rpm.

### 2.2.3. Diseño de Oligonucleótidos

En la realización de este trabajo se han empleado dos tipos de oligonucleótidos, unos diseñados para mutagénesis dirigida y otros para la amplificación de secuencias concretas a partir de ADN plasmídico. Cuando los oligonucleótidos eran diseñados para mutagénesis dirigida se tuvieron en cuenta los siguientes requisitos:

1.- Los dos oligonucleótidos deben presentar la misma mutación, siendo complementarios entre sí, hibridando entre ellos en las mismas posiciones.

2.- Los oligonucleótidos fueron diseñados, normalmente, con unas 25 bases.

3.- La temperatura de fusión ( $T_m$ , del inglés melting temperature) debe de estar entre 75-80 °C. Este valor se calcula usando la siguiente fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 675/N,$$

donde % GC indica el porcentaje de guaninas y citosinas y N es la longitud en pares de bases (bp) del oligonucleótido.

4.- Es recomendable que la mutación que se quiere introducir se localice centrada dentro del oligonucleótido, con unas 10-15 bases a cada lado, flanqueando la mutación.

5.- El contenido en G-C de los oligonucleótidos debe de oscilar entre el 40-60 %. Aquellos oligonucleótidos que presenten un contenido menor en G-C deben diseñarse de mayor longitud para conseguir una  $T_m$  óptima.

Por otra parte, cuando los oligonucleótidos eran diseñados para la amplificación de secuencias concretas a partir de ADN plasmídico, se tuvieron en cuenta los siguientes requisitos:

1.- Los oligonucleótidos eran diseñados con unas 30 bases de longitud, introduciendo en el extremo 5' las dianas de restricción apropiadas, para su posterior clonación en otro vector.

2.- Antes de las dianas de restricción es recomendable introducir 3-5 bases para facilitar la función de la enzima de restricción.

#### **2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) llevadas a cabo en este trabajo fueron realizadas usando la polimerasa AccuSure (NEB) y un termociclador MJ Mini (BioRad).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ L que contenía 1 unidad de la polimerasa AccuSure (NEB), 5  $\mu$ L del tampón 10x de la polimerasa, unos 50 ng de ADN molde, 2,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido (SIGMA) y H<sub>2</sub>O miliQ hasta completar los 50  $\mu$ L.

La reacción de PCR consistió en 1 minuto a 95 °C para la activación de la enzima, 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 55 °C y 12 minutos de polimerización a 72 °C. La reacción finalizó

con 10 minutos a 72 °C para permitir la elongación de todas las cadenas de ADN.

En el caso de PCR mutagénicas, una vez finalizada la reacción de PCR se procedió a la degradación del ADN molde, usando para ello la enzima de restricción *DpnI* (NEB). Esta enzima se caracteriza por ser capaz de reconocer y cortar específicamente las secuencias  $GA^m\downarrow TC$ , donde la A se encuentra metilada, algo que sólo sucede en el ADN molde procedente de *E. coli* y no en el ADN generado durante la reacción de PCR *in vitro*. Para ello, al producto de la PCR se le añadieron 0,5  $\mu L$  de *DpnI* (10 unidades  $\mu L^{-1}$ ) y se incubó al menos durante 1 hora a 37 °C.

Por otro lado, si la reacción de PCR iba destinada a la amplificación de fragmentos de ADN para su posterior clonación en otros vectores, una vez finalizada la PCR se realizaba una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para purificar la banda de interés (ver apartado 2.2.6, Materiales y Métodos). Para la recuperación de la banda de ADN de interés embebida en agarosa se empleó el kit “FavorPrep Gel/PCR DNA Extraction Kit” (FAVORGEN).

### 2.2.5. Clonación de los Productos de PCR

La clonación de los fragmentos amplificados mediante PCR se realizó mediante ligación. Para ello, tanto los productos de PCR como el plásmido fueron digeridos con las enzimas apropiadas. Con este objetivo, 1  $\mu g$  de ADN se mezcló con 0,3  $\mu L$  de cada una de las dos enzimas de restricción, 1  $\mu L$  del tampón de reacción de las enzimas de restricción y  $H_2O$  miliQ hasta completar los 10  $\mu L$  del volumen de reacción final. Tras 3 horas de digestión a la temperatura requerida por las enzimas de restricción, se procedió a la

purificación del ADN mediante el kit “FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit” (FAVORGEN).

Tras esto se procedió a la clonación de los productos de PCR en los vectores apropiados, usando el siguiente protocolo de ligación en un volumen final de 10  $\mu$ L, que contenía: 3  $\mu$ L de producto de PCR digerido, 1  $\mu$ L de ADN plasmídico digerido, 1 unidad de la ligasa de ADN del bacteriófago T4 (ROCHE), 1  $\mu$ L del tampón 10x de la ligasa y H<sub>2</sub>O miliQ hasta completar los 10  $\mu$ L. La reacción de ligación se llevó a cabo a 25 °C durante toda la noche.

Finalmente, con el objetivo de seleccionar la construcción con el inserto apropiado, la reacción de ligación se empleó para la transformación de células DH5 $\alpha$  de *E. coli* (ver apartado 2.2.2, Materiales y Métodos). Esta suspensión celular se sembró en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado y se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se picaron algunas colonias en 5 mL de LB suplementado con antibióticos dejándolas crecer a 37 °C y 200 rpm durante 16 horas, para finalmente extraer el ADN plasmídico y analizarlo por restricción, comprobando la presencia del inserto mediante electroforesis en gel de agarosa y secuenciación (ver apartados 2.2.6 y 2.2.7, Materiales y Métodos).

#### **2.2.6. Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa**

La separación de fragmentos de ADN, tanto para comprobar la presencia de un inserto en un vector tras una ligación como para la purificación de un producto de PCR, se realizó según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989), basado en el uso de geles de agarosa al 1 % (p/v), preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM) diluido al 50 %, añadiendo bromuro

de etidio a una concentración final de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El bromuro de etidio permite la visualización de ADN, al intercalarse en el ADN de doble cadena y emitir fluorescencia tras ser irradiado con luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron a 50 V usando para ello el sistema ADN Sub Cell (BioRad). A cada muestra se le añadió tampón de carga a una relación 1/10 (0,25 % (p/v) de azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) de xileno-cianol y 30 % (p/v) de glicerol en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Para la determinación de los tamaños de los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis se emplearon indistintamente el marcador VII (ROCHE) o el marcador 2-Log (NEB).

### 2.2.7. Secuenciación de ADN

La determinación de las secuencias de ADN se realizó en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid), usando para ello los oligonucleótidos genéricos M13F, M13R o T7 en función del plásmido utilizado.

## 2.3. Obtención de los Mutantes de Citocromo c

### 2.3.1. Obtención de los Mutantes A111C y E104C

Los plásmidos *pCytA* y *pCytH* (Rodríguez-Roldán *et al.*, 2006), los cuales contienen las regiones codificantes del Cc de *A. thaliana* o de *H. sapiens*, respectivamente, fueron empleados para obtener mediante PCR mutagénica los mutantes A111C o E104C, respectivamente. Para ello, mediante PCR mutagénica, se reemplazó por una cisteína la alanina carboxi-terminal en el Cc de *A. thaliana* o el glutámico carboxi-terminal en el caso del Cc de *H. sapiens* (Figura 26).

Cc A111C
ASFDEAPPGNPKAGEKIFRTKCAQCHTVEKGAGHKQGPNLN GLFGRQSGTTPGYSYSAANKSMAVNWEEKTLYDYLLNPKKY IPGTKMVFPGLKKPQDRADLIAYLKEGT <b>C</b>
Cc E104C
GDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTG QAPGYSYTAANKNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIPGTKMIFV GIKKKEERADLIAYLKATN <b>C</b>

**Figura 26. Secuencia de los mutantes de Cc A111C y E104C.** La cisteína carboxi-terminal introducida en ambos casos mediante PCR mutagénica se resalta en color rojo.

Los oligonucleótidos usados para la obtención de ambas variantes fueron en el caso de *A. thaliana* 5'-gaaggcacctgttgatgaattc-3' y 3'-ctccgtggacaactacttaag-5' y en el caso de *H. sapiens*: 5'-gcgaccaattgctgatgaattc-3' y 3'-cgctggtaacgactacttaag-5'.

### 2.3.2. Expresión y Purificación de los Mutantes A111C y E104C

Ambas variantes de Cc, A111C y E104C, se expresaron y purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico, usando para ello una columna de carboximetil- celulosa (SIGMA), como se ha descrito previamente (Rodríguez-Roldán *et al.*, 2006).

Para ello, células competentes BL21 se transformaron con el vector *pEC86* (Arslan *et al.*, 1989), el cual contiene el operón *ccm* responsable de la síntesis e incorporación del grupo hemo en la cadena polipeptídica, y el vector *pE104C* o *pA111C*, dependiendo de que se quisiera expresar el Cc de *H. sapiens* o de *A. thaliana*, respectivamente. Las células transformadas se inocularon en un matraz de 50 mL con 20 mL de LB suplementado con cloranfenicol y

ampicilina, el cual se cultivó a 150 rpm y 37 °C durante 16 horas. Tras esto, se inocularon 3 mL de este preinóculo en matraces de 5 L conteniendo 3 L de LB, suplementado con cloranfenicol, ampicilina y citrato de hierro-amonio. Transcurridas 24 horas, las células se recogieron mediante centrifugación (ver apartado 2.1.4, Materiales y Métodos), y se resuspendieron en un volumen mínimo de H<sub>2</sub>O destilada, conteniendo 1 mM de inhibidores de proteasas (benzamidina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y ácido amino-caproico) y 1 U de ADNasa I (SIGMA), rompiéndose las células mediante sonicación.

Los extractos celulares se sometieron a centrifugación a 24.000 rpm durante 20 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante se puso en borato 1,5 mM, pH 8,5, usando para ello borato 15 mM, pH 8,5, ajustando finalmente el pH del extracto celular. El extracto se cargó en una columna de carboximetil-celulosa equilibrada en borato 1,5 mM, pH 8,5. Una vez pasado todo el extracto, la columna se lavó con 2 volúmenes del mismo tampón, eliminando de este modo las proteínas no unidas a la matriz. Finalmente, la elución del Cc se realizó con el mismo tampón usando un gradiente continuo de NaCl 25-250 mM en el caso de A111C, o NaCl 36-360 mM en el caso de E104C. Las fracciones se recogieron usando un colector FRAC-100 (Pharmacia), en volúmenes de 2-5 mL.

La pureza de las distintas fracciones se determinó de forma espectrofotométrica en un espectrofotómetro de haz simple DU 650 (Beckman-Coulter), usando para ello cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Se consideraron como puras aquellas fracciones con una relación de pureza igual o menor que 1, medida como  $Abs_{278nm}/Abs_{550nm}$ . La determinación de la concentración de ambos citocromos se realizó usando sus respectivos



coeficientes de extinción,  $31,81 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el caso del Cc de *A. thaliana* y  $31,54 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el caso del Cc de *H. sapiens* (Rodríguez-Roldan *et al.*, 2006).

## 2.4. Métodos de Estudio de Apoptosis en Células *Jurkat*

### 2.4.1. Inducción de Apoptosis

Cultivos de células *Jurkat* en fase exponencial de crecimiento (ver apartado 2.1.3, Materiales y Métodos) fueron empleados para la inducción de apoptosis con camptotecina (CPT, Calbiochem)  $10 \text{ }\mu\text{M}$  durante 6 horas (Johnson *et al.*, 1997), de modo que estuviéramos seguros que el Cc había sido liberado desde la mitocondria hacia el citosol (Goldstein *et al.*, 2000).

### 2.4.2. Determinación de Apoptosis Mediante Tinción con DAPI

Células *Jurkat* tratadas o no tratadas con CPT  $10 \text{ }\mu\text{M}$  fueron recogidas mediante centrifugación a  $1.000 \text{ g}$  durante 5 minutos, resuspendidas en tampón PBS conteniendo  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  de DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) e incubadas en este tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Las células fueron examinadas usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 equipado con un filtro específico para DAPI, y las células apoptóticas fueron identificadas por la presencia de cuerpos apoptóticos densamente teñidos (Han *et al.*, 2001). Para la determinación del porcentaje de células apoptóticas en cada caso se contaron al menos 500 células, realizando tres réplicas independientes.

### 2.4.3. Determinación de Apoptosis Mediante Citometría de Flujo

Las células *Jurkat*, tratadas o no tratadas con CPT 10  $\mu\text{M}$ , fueron recogidas mediante centrifugación y fijadas con etanol al 70 % durante 1 hora. Tras esto, las células fueron recogidas de nuevo por centrifugación, resuspendidas en una solución de yoduro de propidio (Nicoletti *et al.*, 1991), incubadas a 37 °C durante 1 hora y analizadas mediante citometría de flujo, usando para ello un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACS Vantage. Las células con un contenido de ADN inferior al normal en la fase G1 fueron consideradas apoptóticas.

### 2.4.4. Ensayo de Fragmentación de ADN

Tras inducir apoptosis con CPT 10  $\mu\text{M}$  en células *Jurkat* a diferentes tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) se realizó un ensayo para detectar la fragmentación en forma de escalera del ADN genómico, típica del proceso de apoptosis, tal y como se ha descrito anteriormente en la literatura (Liu *et al.*, 1996). En resumen, las células fueron recogidas por centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, lavadas dos veces en PBS, recogidas nuevamente por centrifugación e incubadas durante toda la noche a 37 °C con 500  $\mu\text{L}$  de tampón D (100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2 % (p/v) SDS, y 0,2  $\text{mg mL}^{-1}$  de proteinasa K). Posteriormente, se añadió NaCl 1,5 M y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. El ADN en el sobrenadante fue precipitado con un volumen igual de etanol al 100 %, centrifugando a 12.000 g durante 10 minutos. El ADN fue posteriormente lavado con etanol al 70 % e incubado durante 2 horas a 37 °C en el tampón E

(10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ARNasa A libre de ADNasa). Finalmente, el ADN fue cargado en un gel al 2 % (p/v) de agarosa (ver apartado 2.2.6, Materiales y Métodos) y la electroforesis fue realizada a 50 V durante 2 horas en tampón TBE.

#### 2.4.5. Ensayo de Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de exclusión de azul Trypan. Para ello, células *Jurkat* tratadas o no con CPT  $10 \mu\text{M}$  durante tiempos variables (0, 3, 6, 10 y 24 horas) fueron recogidas mediante centrifugación a  $1.000 \text{ g}$  durante 5 minutos. Las células fueron posteriormente resuspendidas en azul Trypan (SIGMA) y contadas usando un hemocitómetro. El porcentaje de viabilidad de las células *Jurkat* se obtuvo dividiendo el número de células viables (no teñidas con azul Trypan) por el número de células totales.

### 2.5. Métodos de Estudio de PCD en Células de *Arabidopsis thaliana*

#### 2.5.1. Inducción de PCD

La muerte celular en cultivos de *A. thaliana* se indujo como anteriormente se ha descrito en la literatura (De Pinto *et al.*, 2006) en cultivos de células en suspensión de la línea MM2d de *A. thaliana*, crecidos como se explicó anteriormente (ver apartado 2.1.2, Materiales y Métodos). En resumen, un cultivo estacionario de células MM2d de *A. thaliana* fue diluido 5/100 (v/v). Tras tres días creciendo en condiciones normales se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM como inductor de PCD (Desikan *et al.*, 1998).

### 2.5.2. Medida de Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de exclusión de azul Trypan, tal y como se ha descrito con anterioridad (De Pinto *et al.*, 1999). Para los análisis de viabilidad celular, se tomaron muestras de 1 mL de los cultivos líquidos de células MM2d de *A. thaliana* a diferentes tiempos, tras lo cuál se diluyeron alícuotas de 15  $\mu$ L de cultivo celular 1:1 con azul Trypan (SIGMA). La suspensión celular se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, antes de su visualización usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX60. La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la realización aleatoria de fotografías, para el posterior conteo de entre 400-500 células.

### 2.5.3. Seguimiento de los Cambios Morfológicos

Para el seguimiento de los cambios morfológicos asociados al proceso de PCD en plantas (por ej. condensación de la cromatina o condensación del citoplasma), se procedió a la tinción con DAPI. Para ello se tomaron muestras a diferentes tiempos, que se incubaron con DAPI a una concentración final de 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Esta tinción permite detectar la condensación de la cromatina en las células muertas, la cual aparece como una intensa fluorescencia azul a 461 nm al iluminar a 358 nm.

### 2.5.4. Determinación de la Concentración de Proteína y Clorofila

El contenido de proteína total de los extractos se realizó siguiendo la modificación del método de Lowry (Markwell *et al.*, 1978), usando albúmina de

suero bovina (BSA) como patrón y midiendo la absorbancia de las muestras a 750 nm.

La determinación de clorofila se realizó según el método propuesto por MacKinney en 1941. Para ello se tomaron muestras de 1 mL a distintos tiempos y por triplicado. Tras recoger las células mediante centrifugación a 12.000 g durante 1 minuto, el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de metanol, incubando la mezcla durante 5 minutos. Tras esto se precipitaron los restos celulares mediante centrifugación, se midió la absorbancia de las muestras a 665 nm, tras realizar el blanco con metanol, y se determinó la concentración de clorofila usado como coeficiente de extinción  $13,43 \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$  mL (MacKinney, 1941).

## 2.6. Preparación de Extractos para Cromatografía de Afinidad

### 2.6.1. Células *Jurkat*

Los extractos totales de células *Jurkat*, tratados o no con CPT 10  $\mu\text{M}$ , necesarios para los ensayos de cromatografía de afinidad fueron preparados a partir de 1,8 L de cultivo de células (ver apartados 2.1.3 y 2.4.1, Materiales y Métodos). En ambos casos, las células se recogieron mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, lavándolas dos veces en PBS. Las células fueron recogidas nuevamente mediante centrifugación y lisadas mediante sonicación en tampón I (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 0,25 % (p/v) Triton X-100) conteniendo PMSF 1 mM, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de aprotinina, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de leupeptina y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de inhibidor de la tripsina de soja. Posteriormente, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 minutos

a 4 °C. Finalmente la muestra se alicuoteó y las alícuotas resultantes se almacenaron a -80 °C.

### **2.6.2. Células MM2d de *Arabidopsis thaliana***

Los extractos totales de *A. thaliana* para realizar los análisis de cromatografía de afinidad, a partir de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM o no tratadas, se prepararon a partir de 0,5 L de cultivo de células (ver apartados 2.1.2 y 2.5.1, Materiales y Métodos). En ambos casos, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 min, lavadas dos veces con PBS y recogidas nuevamente por centrifugación. Tras esto las células se resuspendieron y se lisaron mediante sonicación en tampón I. Posteriormente, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras resultantes se alicuotearon y se almacenaron a -80 °C.

## **2.7. Cromatografía de Afinidad: Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c**

### **2.7.1. Montaje de las Columnas para la Cromatografía de Afinidad**

Las columnas para llevar a cabo la identificación de nuevas dianas, tanto del Cc de *A. thaliana* como del Cc de *H. sapiens*, mediante cromatografía de afinidad se prepararon uniendo covalentemente A111C o E104C a la matriz de tiol-sefarosa 4B (TS-4B, Pharmacia), respectivamente, como se ha descrito anteriormente (Azzi *et al.*, 1982). En resumen, 30 mg de A111C o E104C en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) pretratado con DTT 1 mM para eliminar los puentes disulfuro intermoleculares, se añadieron a una suspensión de 4 mL de

TS-4B (1 g) en el mismo tampón. La suspensión se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación, tras lo que se cargó en una columna de cromatografía Poly-Prep (Biorad). Posteriormente, la matriz se lavó usando 5 mL de acetato-sódico 50 mM y 2-mercaptoetanol 1,5 mM (pH 4,5) para bloquear los grupos tioles que no habían reaccionado. Con el objetivo de eliminar el Cc no unido covalentemente, la matriz se lavó con 30 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) suplementado con NaCl 1 M y 1 % (p/v) de Tritón X-100. Finalmente, la matriz se equilibró con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Igualmente se preparó una columna control siguiendo el mismo proceso, con la excepción del paso de adición de Cc, que no fue añadido.

### 2.7.2. Purificación de Nuevas Dianas del Citocromo c

Los extractos totales de células *Jurkat*, tratadas o no con CPT 10 µM, o de *A. thaliana*, tratadas o no con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM, fueron cargados en una columna control o en una columna con E104C, en el caso de los extractos procedentes de células *Jurkat*, o A111C, en el caso de extractos procedentes de *A. thaliana*. Posteriormente, las columnas fueron lavadas con 30 mL de tampón I (ver apartado 2.6.1, Materiales y Métodos) y 30 mL de tampón II (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 75 mM NaCl), con el objetivo de eliminar proteínas no unidas o débilmente unidas a la matriz. Finalmente, las proteínas unidas más fuertemente fueron eluidas usando 30 mL de tampón III (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl), recogidas, liofilizadas y almacenadas a -80 °C. Por lo tanto, en cada caso se obtuvieron cuatro tipos de muestras: 1) extractos de células no tratadas purificadas con una columna control, 2) extractos de células no tratadas purificadas con una columna con A111C o E104C unido, 3)

extractos de células tratadas con CPT, en el caso de células *Jurkat*, o con  $H_2O_2$ , en el caso de células de *A. thaliana*, usando una columna control y 4) como en 3) pero usando una columna con E104C o A111C unido, respectivamente.

## 2.8. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c

### 2.8.1. 2D SDS-PAGE. Muestras Procedentes de Células *Jurkat*

Las muestras obtenidas a partir de células *Jurkat*, tratadas o no con CPT 10  $\mu M$ , mediante cromatografía de afinidad (ver apartado 2.7, Materiales y Métodos) fueron analizadas mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida con SDS (2D SDS-PAGE). El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado con el sistema Protean IEF Cell (Biorad) usando tiras ReadyStrip IPG de 7 cm (Biorad) con un gradiente lineal de pH (pH 3-10). Las proteínas liofilizadas (150  $\mu g$ ) fueron resuspendidas en 125  $\mu L$  de tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, 2 % (p/v) de CHAPS, DTT 30 mM, 0,5 % (v/v) de anfolitos Bio-Lyte 3/10 (Biorad) y trazas de azul de bromofenol). Tras la rehidratación de las proteínas, las tiras ReadyStrip IPG fueron rehidratadas con esta solución durante 14 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente las muestras fueron separadas mediante IEF en las tiras ReadyStrip IPG hasta 16.000 Vh. Tras esto, las tiras de IEF fueron incubadas con los tampones de equilibrado I (6 M urea, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 2% (p/v) SDS, 20% (p/v) glycerol, 2% (p/v) DTT) y II (6 M urea, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 2% (p/v) SDS, 20% (p/v) glycerol, 2,5% (p/v) iodoacetamida), de modo secuencial durante 15 minutos. Finalmente, las tiras de IEF fueron colocadas sobre geles al 12 % de poliacrilamida (8 cm x 7 cm) y la segunda



dimensión se llevó a cabo aplicando 100 V durante 2 horas en un sistema Mini-Protean DODECA 3 Cell (Biorad). Los geles 2D fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal (Candiano *et al.*, 2004) y analizados usando el software de PDQuest 2D (v 8.0.1) (Biorad).

### **2.8.2. Preparación de las Muestras de Proteínas de Células *Jurkat* para Espectrometría de Masas**

Las manchas de los geles que iban a ser analizadas mediante espectrometría de masas para su identificación fueron extraídas usando puntas de pipeta. Las proteínas seleccionadas fueron reducidas en gel con DTT y digeridas con tripsina (Sechi y Chait, 1998). En resumen, las manchas fueron lavadas dos veces con agua, tratadas 15 minutos con acetonitrilo al 100 % y secadas durante 30 minutos en un Savan SpeedVac. Tras esto, las muestras fueron reducidas durante 30 minutos a 56 °C con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM, y posteriormente tratadas con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 25 mM durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de tripsina (ROCHE) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8,5) a 37 °C durante toda la noche.

Tras la digestión, el sobrenadante fue recogido y 1  $\mu\text{L}$  fue cargado sobre una placa de MALDI y secado a temperatura ambiente. Entonces, a la mezcla de péptidos digeridos se le añadieron 0,4  $\mu\text{L}$  de una solución 3 mg  $\text{mL}^{-1}$  de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-transcinámico (SIGMA) en acetonitrilo al 50 %, permitiendo que la muestra se secase nuevamente a temperatura ambiente.

### **2.8.3. Identificación de las Dianas del Citocromo *c* en Células *Jurkat* Mediante MALDI-TOF/MS**

Los análisis de MALDI-TOF-MS fueron realizados en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems), funcionando en modo de reflector positivo, con un voltaje de 20.000 V, en el Centro de Genómica y Proteómica, Universidad Complutense de Madrid.

Todos los espectros de masas fueron calibrados usando los péptidos de auto-digestión de la tripsina.

El análisis mediante MALDI-TOF/TOF MS da lugar a huellas peptídicas, y los péptidos obtenidos con una ratio (señal/ruido) mayor de 10 son recogidos y representados como una lista de masas moleculares monoisotópicas.

Las proteínas identificadas de forma ambigua mediante huella peptídica fueron sometidas a análisis de secuenciación MS/MS usando el 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Para ello, se seleccionaron precursores disponibles a partir de los espectros de MS para análisis de MS/MS con el CID en modo de reflector de iones y una ventana para la masa del precursor de  $\pm 5$  Da. El modelo de placa y la calibración por defecto fueron optimizados para el procesamiento de los espectros de MS/MS.

### **2.8.4. Análisis Bioinformático de los Datos de MALDI-TOF/MS**

Para la identificación de las proteínas, se empleó la base de datos UniProtKB-SwissProt v57.7 usando una licencia local de MASCOT 2.1 a través del Servidor Global de Proteínas v 3.6 (Applied Biosystems).

En todas las identificaciones, las probabilidades fueron mayores que la puntuación establecida por MASCOT como significativa con un valor  $p$  menor de 0,05.

#### **2.8.5. Identificación de las Dianas del Citocromo *c* en Células de *Arabidopsis thaliana* Mediante NanoLC-MS/MS**

Las muestras de proteínas obtenidas a partir de células MM2d de *A. thaliana*, tratadas o no con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM, fueron digeridas con tripsina. Para ello, las muestras fueron tratadas con urea 8 M y DTT 10 mM. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, se añadió iodoacetamida a una concentración final de 55 mM y se incubó durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron posteriormente diluidas con bicarbonato amónico 25 mM hasta una concentración final de urea 2 M y se añadieron 25 µg de tripsina recombinante, incubando la mezcla durante toda la noche a 37 °C.

Los péptidos resultantes fueron analizados usando un nanoLC-MS/MS en una trampa iónica (LTQ, Thermo Electron San Jose, CA, USA). Los péptidos fueron separados en una columna BioBasic C-18 PicoFrit a un flujo de 200 nL min<sup>-1</sup>. Como tampones A y B, se usaron agua y acetonitrilo, ambos conteniendo 0,1 % de ácido fórmico. Los péptidos fueron atrapados y desalados en la columna durante 5 minutos. Posteriormente, se comenzó el gradiente y se mantuvo durante 5 minutos con un 5 % de tampón B, se aumentó el tampón B al 50 % en un intervalo de 120 minutos, tras esto se aumento al 70 % en un intervalo de 10 minutos y finalmente se mantuvo al 95 % durante otros 10 minutos. El espectrómetro de masas se usó en el modo dependiente de datos para cambiar automáticamente entre la adquisición de MS y MS/MS. Los

parámetros para el escaneo de iones fueron los siguientes: escáner completo para MS (400-1.800 m/z) mas los siete picos principales para MS/MS (ancho de aislamiento 2 m/z) y energía de colisión normalizada al 35 %.

#### **2.8.6. Análisis Bioinformático de los Datos de nanoLC-MS/MS**

Los péptidos obtenidos mediante nanoLC-MS/MS fueron identificados con MASCOT 2.1 usando la base de datos UniProt\_Arabidopsis (90895 secuencias). En todas las identificaciones, las puntuaciones de probabilidad fueron superiores a lo establecido por MASCOT como significativo, con un valor  $p$  menor de 0,05.

### **2.9. Estudio *in vivo* de la Interacción entre el Citocromo c y sus Dianas: Complementación Bimolecular de la Fluorescencia, BiFC**

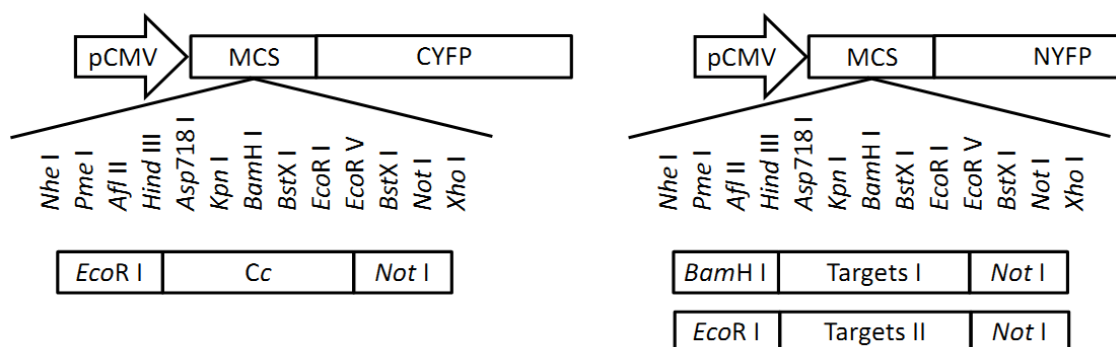
#### **2.9.1. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo c Humano en Células HEK293T**

Los cDNAs codificantes, tanto para el Cc humano como para las proteínas identificadas mediante cromatografía de afinidad como nuevas dianas del Cc, se adquirieron de GeneService ([www.lifesciences.sourcebioscience.com](http://www.lifesciences.sourcebioscience.com)). Estos cDNAs fueron amplificados mediante PCR (ver apartado 2.2.4, Materiales y Métodos), introduciéndoles los sitios de restricción necesarios para su posterior clonación dentro de los vectores *pCYFP* o *pNYFP* diseñados a partir del vector *pcDNA 3.1* (Invitrogen) (Gandia *et al.*, 2008) usando para ello los oligonucleótidos mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos para los ensayos de BiFC de proteínas humanas en células HEK293T.	
Cc (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgggtgatgttgagaaaggcaag-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcattagtagctttttgagat-3'
CSNKII $\beta$ (BamHI/NotI)	Fw: 5'-CTCGGAtccatgagcagctcagaggaggtgtcc-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcgcaatcgctcttgactgggc-3'
CORO1A (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgagccggcaggtggctccgtcc-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcctcttgccctggactgtctcct-3'
eIF2 $\alpha$ (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgccgggtctaagttgtagattt-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcaagtatcttcagctttggctt-3'
ALDOA (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgccctaccaatatccagcactg-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcttaaggcgtggttagagacga-3'
PVALB (BamHI/NotI)	Fw: 5'-CTCGGAtccatgtcgtatgacagacttgctgaac-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcttgcttcagccaccagagtgg-3'
TUBB (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgagggaaatcgtgcacatccag-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcgcctcctcttcggcctcctcac-3'
YWHAE (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggtatgacgagaggatctggtg-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcctgatttctgtctccacgt-3'
hnRNP C1/C2 (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggccagcaacgttaccacaag-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcaaagagtcacctcgccattgg-3'
MCM6 (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggacctcgccgagcagcgag-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcaacttcgagcaagtagttag-3'
PROX1 (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgcctgacctgacagcacagcc-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcctctcatgaagcagctcttgta-3'
SET (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatgtcggcgccggcgccaaagtc-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcttgctatcttctctctatcct-3'
ANP32B (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggacatgaagaggaggatccac-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcatcatcttctccttcatcat-3'
MCM7 (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggcactgaaggactacgcgcta-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcgacaaaagtgatccgtgtcc-3'
NCL (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggtgaagctcgcgaaggcaggt-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgccttcaaaactcgtcttcttc-3'
NPM (EcoRI/NotI)	Fw: 5'-GTGGAATcatggaagattcgatggacatggac-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgcattttcttaagagacttctcc-3'
STRAP (BamHI/NotI)	Fw: 5'-CTCGGAtccatggcaatgagacagacgccgctc-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgctcgcccttaacatcaggagctg-3'
HSPA5 (BamHI/NotI)	Fw: 5'-CTCGGAtccatgaagctctccctggtggccg-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGccgccacaactcatcttttctgctg-3'

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de *H. sapiens* como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en células HEK293T. En cada caso se indican las dianas de restricción adecuadas que se introdujeron mediante PCR para su posterior clonación en los vectores *pCYFP* o *pNYFP*.

Una vez amplificados los cDNAs, estos fueron ligados en los vectores apropiados (ver apartado 2.2.5, Materiales y Métodos) (Figura 27).



**Figura 27. Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en células HEK293T, usando los vectores *pCYFP* (*Cc* de *H. sapiens*) o *pNYFP* (dianas del *Cc*).** El *Cc* se introdujo en el vector *pCYFP* usando para ello las dianas *EcoRI* y *NotI*, mientras que las dianas del *Cc* clonadas en el vector *pNYFP* se distribuyeron en dos grupos: 1) Targets I: se clonaron usando las dianas *BamHI* y *NotI* y 2) Targets II: se clonaron usando las dianas *EcoRI* y *NotI*.

Como control positivo en los ensayos de BiFC se usaron los vectores *pBiFC-bJunYN155* y *pBiFC-bFosYC155*, mientras que como control negativo se emplearon los vectores *pBiFC-bFosΔZipYC155* y *pBiFC-bJunYN155* (Hu *et al.*, 2002). En el diseño de estos vectores se tomaron los dominios bZip de las proteínas Fos (bFos conteniendo los aminoácidos 118 a 210 de Fos) y Jun (bJun que contiene los aminoácidos 257 a 318 de Jun). La proteína bFosΔZip contiene el fragmento bFos, al que se le han delecionado los aminácidos comprendidos entre el 179 y el 193, ambos incluídos. El fragmento bJun fue fusionado al extremo amino-terminal de la NYFP (aminoácidos 1 a 154 de la YFP) en el vector *pHA-CMV* (Clontech), y los fragmentos bFos y bFosΔZip fueron fusionados al extremo amino-terminal de la CYFP (aminoácidos 155 a 238) en el vector *pFLAG-CMV2* (SIGMA).

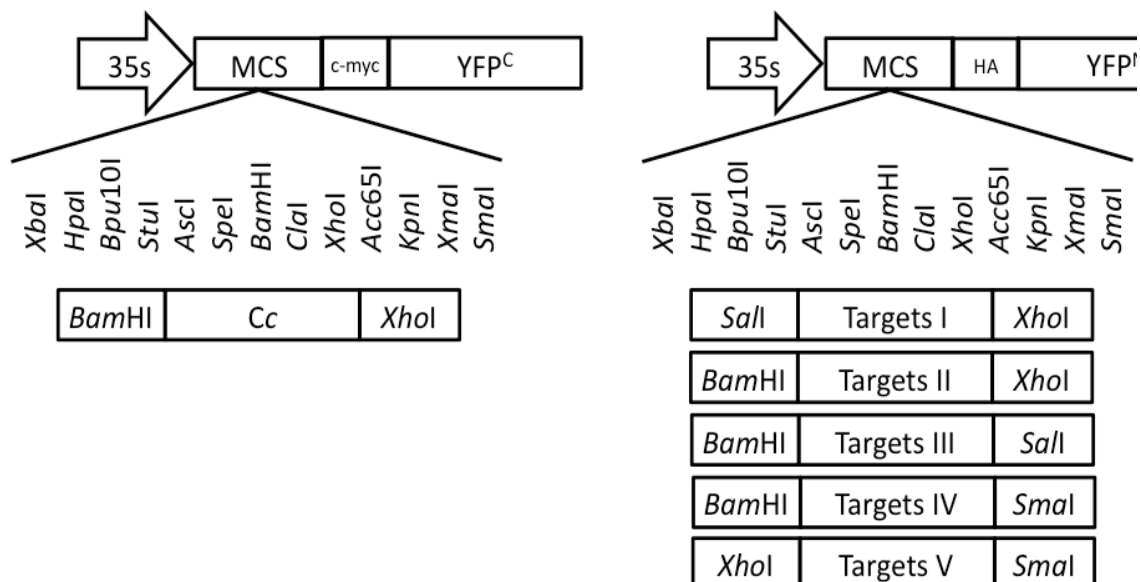
### 2.9.2. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* en Protoplastos

Tanto el cDNA codificante para el Cc de *A. thaliana* como los cDNAs codificantes para las nuevas dianas del Cc fueron comprados a ABRC Stock ([www.arabidopsis.org/abrc/](http://www.arabidopsis.org/abrc/)). Estos cDNAs fueron amplificados mediante PCR (ver apartado 2.2.4, Materiales y Métodos), introduciendo los sitios de restricción requeridos para su posterior clonación en los vectores *pSPYCE* o *pSPYNE* (Walter *et al.*, 2004), usando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos para los ensayos de BiFC de proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en protoplastos.	
Cc ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGGCGTCGTTTGATGAA-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGCTTAGGCGCAGTAGATTC-3'
eIF2 $\gamma$ ( <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGTCTGAGGAACAAGGGT-3'
	Rv: 5'-CCGGTCTGACGAAAGGTGAAGGAGGAAC-3'
GAPDC1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGGCTGACAAGAAGATT-3'
	Rv: 5'-CCGCCCCGGGGGCCTTTGACATGTGGAC-3'
GLY2 ( <i>Sal</i> I/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGTCTGACATGAAGATCTTCCACGTT-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGTCCCCTCCACTGATCCTT-3'
NRP1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGGTCGCGGACAAGAGC-3'
	Rv: 5'-CCGGTCTGACTTCCTCACCATCTTCCTC-3'
Sm/D1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGAAGCTCGTCAGGTTT-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGACGACCACCACGGCCACG-3'
TCL ( <i>Xho</i> I/ <i>Sma</i> I)	Fw: 5'-CCGCTCGAGATGTCTGACTGGATTAGAT-3'
	Rv: 5'-CCGCCCCGGGGTTTGTCTCCATATCTCC-3'
BiP1 ( <i>Sal</i> I/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGTCTGACATGGCTCGCTCGTTTGGA-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGGAGCTCATCGTGAGACTC-3'
BiP2 ( <i>Sal</i> I/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGTCTGACATGGCTCGCTCGTTTGGA-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGGAGCTCATCGTGAGACTC-3'
RD21 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-CCGGGATCCATGGGGTTCTTAAGCCA-3'
	Rv: 5'-CCGCTCGAGGGCAATGTTCTTTCTGCC-3'

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de *A. thaliana* como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en protoplastos. En cada caso se indican las dianas de restricción adecuadas que se introdujeron mediante PCR.

Una vez amplificados los cDNAs introduciendo los sitios de restricción requeridos para su posterior clonación en los vectores *pSPYCE* o *pSPYNE* (ver apartado 2.2.5, Materiales y Métodos), estos fueron introducidos en los vectores apropiados (Figura 28).



**Figura 28.** Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en protoplastos de *A. thaliana*, usando los vectores *pSPYCE* (Cc de *A. thaliana*) o *pSPYNE* (dianas del Cc). El Cc se clonó en el vector *pSPYCE*, usando para ello las dianas *BamHI* y *XhoI*, mientras que las dianas del Cc clonadas en el vector *pSPYNE* se dividen en varios grupos: 1) Targets I: se clonaron usando las dianas *Sall* y *XhoI*, 2) Targets II: se clonaron usando las dianas *BamHI* y *XhoI*, 3) Targets III: se clonaron usando las dianas *BamHI* y *Sall*, 4) Targets IV: se clonaron usando las dianas *BamHI* y *SmaI* y 5) Targets V: se clonaron usando las dianas *XhoI* y *SmaI*.

### 2.9.3. Diseño de los Vectores de BiFC para el Análisis de las Interacciones del Citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* en Células HEK293T

Los cDNAs codificantes tanto para el Cc de *A. thaliana* como para sus nuevas dianas fueron amplificados mediante PCR (ver apartado 2.2.4, Materiales y Métodos), introduciendo los sitios de restricción apropiados para su posterior

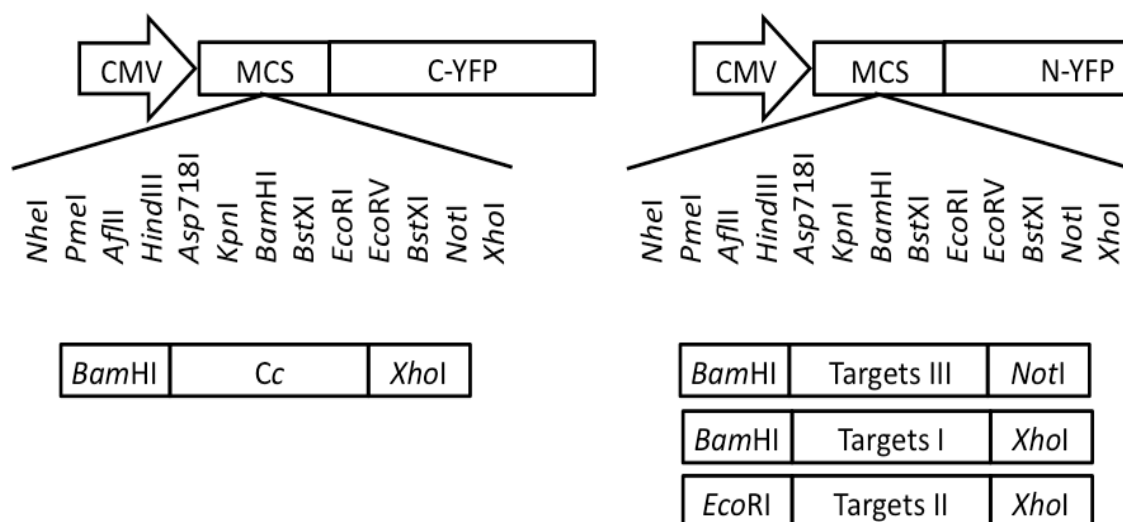


clonación (ver apartado 2.2.5, Materiales y Métodos) en los vectores *pCYFP* o *pNYFP* (Gandia *et al.*, 2008), mediante PCR usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 7.

<b>Tabla 7. Oligonucleótidos para los ensayos de BiFC de proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en células HEK293T.</b>	
Cc ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GCAGGATCCATGGCGTCGTTTGATGAA-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGCTTAGGCGCAGTAGATTC-3'
eIF2 $\gamma$ ( <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Fw: 5'-GTGGGATCCATGTGCGAGGAACAAGGGT-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGCCGCGAAGGTGAAGGAGGAA-3'
GAPDC1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Fw: 5'-GTGGGATCCATGGCTGACAAGAAGATT-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGCCGCGCCTTTGACATGTGGA-3'
GLY2 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGAATTCATGAAGATCTTCCACGTT-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGTCCCCTCCACTGATCCTT-3'
NRP1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Fw: 5'-GTGGGATCCATGGTCGCGGACAAGAGC-3'
	Rv: 5'-CGAGCGGCCGCTCCTCACCATCTTCCT-3'
Sm/D1 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGGATCCATGAAGCTCGTCAGGTTT-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGACGACCACCACGGCCACG-3'
TCL ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGAATTCATGTGCGACTGGATTAGAT-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGGTTTGTCTCCATATCTCC-3'
BiP1 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGAATTCATGGCTCGCTCGTTTGGA-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGGAGCTCATCGTGAGACTC-3'
BiP2 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGAATTCATGGCTCGCTCGTTTGGA-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGGAGCTCATCGTGAGACTC-3'
RD21 ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	Fw: 5'-GTGGGATCCATGGGGTTTCCTTAAGCCA-3'
	Rv: 5'-GGTCTCGAGGGCAATGTTCTTTCTGCC-3'

**Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs tanto del Cc de *A. thaliana* como de sus dianas para el diseño de las construcciones de BiFC en células HEK293T.** En cada caso se indican las dianas de restricción adecuadas que se introdujeron mediante PCR.

Una vez amplificados los cDNAs introduciendo los sitios de restricción requeridos para su posterior clonación en los vectores *pCYFP* o *pNYFP*, estos fueron introducidos en los vectores apropiados (Figura 29).



**Figura 29. Diseño de las construcciones usadas para los ensayos de BiFC en células HEK293T, usando los vectores *pCYFP* (*Cc* de *A. thaliana*) o *pNYFP* (dianas del *Cc*).** El *Cc* se clonó en el vector *pCYFP* usando las dianas *BamHI* y *XhoI*, mientras que las dianas del *Cc* clonadas en *pNYFP* se dividen en tres grupos: 1) Targets I: se clonaron en *BamHI*-*XhoI*, 2) Targets II: se clonaron usando las dianas *EcoRI*-*XhoI* y 3) Targets III: se clonaron usando las dianas *BamHI*-*NotI*.

Como control positivo se emplearon los vectores *pBiFC*-bJunYN155 y *pBiFC*-bFosYC155, mientras que como control negativo se utilizaron los vectores *pBiFC*-bFosΔZipYC155 y *pBiFC*-bJunYN155 (Hu *et al.*, 2002).

#### 2.9.4. Ensayo de BiFC en Células HEK293T

Las células fueron transfectadas transitoriamente con el ADN codificante de las proteínas especificadas en cada caso, usando para ello Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 0,5 µg de ADN por cada construcción fueron diluidos en 50 µL de medio OPTI-MEM

(Invitrogen), mientras que por otra parte se disolvieron 2  $\mu$ L de Lipofectamina en otros 50  $\mu$ L de medio OPTI-MEM, incubándose ambas muestras por separado. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 100  $\mu$ L de las mezclas de ADN-Lipofectamina fueron añadidas a las células. Las células fueron después incubadas durante 24 horas a 37 °C para permitir la expresión de las construcciones. Entonces, 30 minutos antes de inducir la apoptosis con CPT 10  $\mu$ M durante 6 horas, las células fueron tratadas con z-VAD-fmk 50  $\mu$ M (Tocris) (Li *et al.*, 2007), un inhibidor de caspasas.

Las células HEK293T tratadas o no con CPT y crecidas sobre cubres (ver apartado 2.1.3, Materiales y Métodos), fueron montadas usando PBS con glicerol al 75 % y observadas usando un microscopio de fluorescencia Leica DM6000 B, para analizar la interacción del Cc y las distintas dianas a través de la reconstitución de la fluorescencia de la YFP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

#### **2.9.5. Ensayo de BiFC en Células MM2d**

Los ensayos de BiFC en *A. thaliana* se realizaron en protoplastos de células MM2d. Los protoplastos fueron obtenidos a partir de cultivos en suspensión de células en medio MS (ver apartado 2.1.2, Materiales y Métodos). Para ello, se recogieron 50 mL de cultivo mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 50 mL de medio MS-Glucosa/Manitol (0,34 M), suplementado con 1 % (p/v) de celulosa y 0,2 % (p/v) de macerozima. Las células fueron incubadas en este tampón durante 3 horas a 50 rpm en

oscuridad para digerir la pared celular. Tras esto, los protoplastos fueron recogidos mediante centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos, los pellets fueron lavados con 25 mL de medio MS-Glucosa/Manitol (0,34 M) y nuevamente centrifugados. Finalmente, el pellet resultante fue resuspendido en MS-Sacarosa (0,28 M), se centrifugó la suspensión a 800 rpm durante 5 minutos y los protoplastos fueron recuperados del sobrenadante.

Finalmente los protoplastos fueron transformados de acuerdo al método descrito por Sheen (Sheen, 2002) y la reconstitución de la YFP fue analizada 16-24 horas después de la transfección. En resumen, 3  $\mu\text{g}$  de plásmido fueron añadidos a  $2 \times 10^4$  protoplastos, mezclando la solución suavemente. Tras esto, se añadieron 110  $\mu\text{L}$  de una solución PEG/ $\text{Ca}^{2+}$  (4 g PEG 4000, 3 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , 2,5 ml 0,8 M manitol, 1 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$ ), incubándose la mezcla durante 30 minutos a 25 °C. Finalmente, los protoplastos fueron lavados dos veces con la solución W5 (154 mM NaCl, 125 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM KCl, 2 mM MES pH 5,7), centrifugando a 800 rpm durante 5 minutos para eliminar el PEG. Los protoplastos fueron finalmente resuspendidos en 500  $\mu\text{L}$  de medio MS-Glucosa/Manitol (0,34 M) e incubados en oscuridad durante 16-24 horas para permitir la expresión de las construcciones.

Los protoplastos se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM 24 horas antes del análisis mediante microscopía de fluorescencia de la reconstitución de la YFP.

## **2.10. Análisis de la Expresión de las Construcciones de BiFC Mediante Western Blot**

Las células HEK293T transfectadas con las construcciones indicadas en cada caso fueron recogidas 48 horas después de la transfección mediante

centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. Los extractos celulares totales se prepararon mediante ciclos de congelación/descongelación, tras lo cual se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Biorad) usando el Mini Trans-Blot (Biorad). La detección de las construcciones se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal de conejo anti-EGFP (1:1000, BioVision), que posteriormente fue detectado usando un anticuerpo secundario contra conejo conjugado con la peroxidasa de rábano (1:12000, SIGMA). Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas usando el sistema de detección ECL Plus Western Blotting (Amersham).

## **2.11. Análisis *in silico* de las Interacciones del Citocromo c Mediante DOCKING Molecular**

Para determinar *in silico* la posible estructura del complejo formado entre el Cc humano y aquellas dianas cuya estructura ha sido resuelta, se empleó un algoritmo de DOCKING implementado en el paquete de software BiGGER (Palma *et al.*, 2000). Los archivos de coordenadas de las proteínas utilizadas fueron obtenidos a partir del RCSB Protein Data Bank (PDB). Los archivos PDB empleados se muestran en la tabla 8. En cada cálculo de DOCKING se generaron 5.000 soluciones usando un paso angular de 15° y una distancia de 7 Å. En cada caso se usaron las 100 soluciones con mejor puntuación global para la representación de los centros de masa. Todas las imágenes se generaron usando el paquete UCSF Chimera ([www.cgl.ucsf.edu/chimera/](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/)).

Nombre del gen	Archivo PDB	Referencia
ALDOA	4ALD	Dalby <i>et al.</i> , 1999
ANP32B	2JE0	Huyton <i>et al.</i> , 2007
Cc	1J3S	Jeng <i>et al.</i>
PVALB	1RJV	Baig <i>et al.</i> , 2004
YWHAE	2BR9	Yang <i>et al.</i> , 2005

**Tabla 8. Archivos de estructura PDB.** Archivos de estructura obtenidos del PDB, empleados para los estudios de los complejos formados entre el Cc y estas dianas *in silico* mediante técnicas de DOCKING.

## 2.12. Diseño Racional de Mutantes de Citocromo c Humano

A partir de los datos obtenidos del DOCKING, a través de los cuales es posible definir la zona de interacción del Cc con las diferentes dianas, se han diseñado diferentes mutantes de Cc: Gln16Asp, Ile81Asp, Ile81Lys, Lys27Glu y Lys27Ala, mediante PCR mutagénica usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 9 (ver apartado 2.2.4, en Materiales y Métodos).

Tabla 9. Oligonucleótidos para la obtención de mutantes de Cc de humanos	
Cc Gln16Asp	Fw: 5'-ATTATGAAGTGTTCCGATTGCCACACCGTTGAA-3'
	Rv: 5'-TTCAACGGTGTGGCAATCGGAACACTTCATAAT-3'
Cc Lys27Glu	Fw: 5'-AAGGGAGGCAAGCACGAGACTGGGCCAAATCTC-3'
	Rv: 5'-GAGATTTGGCCCAGTCTCGTGCTTGCCCTCCCTT-3'
Cc Lys27Ala	Fw: 5'-AAGGGAGGCAAGCACGCGACTGGGCCAAATCTC-3'
	Rv: 5'-GAGATTTGGCCCAGTCGCGTGCTTGCCCTCCCTT-3'
Cc Ile81Asp	Fw: 5'-CCTGGAACAAAAATGGATTTTGTCTGGCATTAAAG-3'
	Rv: 5'-CTTAATGCCGACAAAATCCATTTTGTTCAGG-3'
Cc Ile81Lys	Fw: 5'-CCTGGAACAAAAATGAAATTTGTCTGGCATTAAAG-3'
	Rv: 5'-CTTAATGCCGACAAATTCATTTTGTTCAGG-3'

**Tabla 9. Oligonucleótidos usados para la obtención de los distintos mutantes de Cc.** Oligonucleótidos diseñados para la mutación racional de residuos presentes en la superficie del Cc inferida a partir de los datos de DOCKING como interfase de interacción entre el Cc humano y las dianas testadas.

### **2.13. Efecto de la Sobreexpresión de Citocromo c Bajo la Sobreexpresión de PVALB o NPM**

Las células HEK293T fueron crecidas y transfectadas como se ha explicado anteriormente (ver apartados 2.1.3 y 2.9.4, Materiales y Métodos) para llevar a cabo los ensayos de BiFC. La apoptosis fue inducida, 24 horas después de llevar a cabo la transfección, con taspargina (TG) 2  $\mu$ M, en los casos en los que se sobreexpresaba la PVALB, o con CPT 10  $\mu$ M, cuando era NPM la proteína sobreexpresada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI 24 horas después de inducir la apoptosis, y el porcentaje de apoptosis se determinó como el cociente entre el número de células en las que la YFP se había reconstituido y presentaban núcleos apoptóticos y el número total de células en las que se había reconstituido la YFP (Han *et al.*, 2001). Para determinar el porcentaje de células apoptóticas en cada caso se realizaron fotografías al azar, y se contaron al menos 500 células en tres réplicas independientes, usando para ello un microscopio de fluorescencia Leica DM6000 B.





### 3. RESULTADOS

*“When a distinguished but elderly scientist states that something is possible he is almost certainly right. When he states that something is impossible, he is very probably wrong.”*

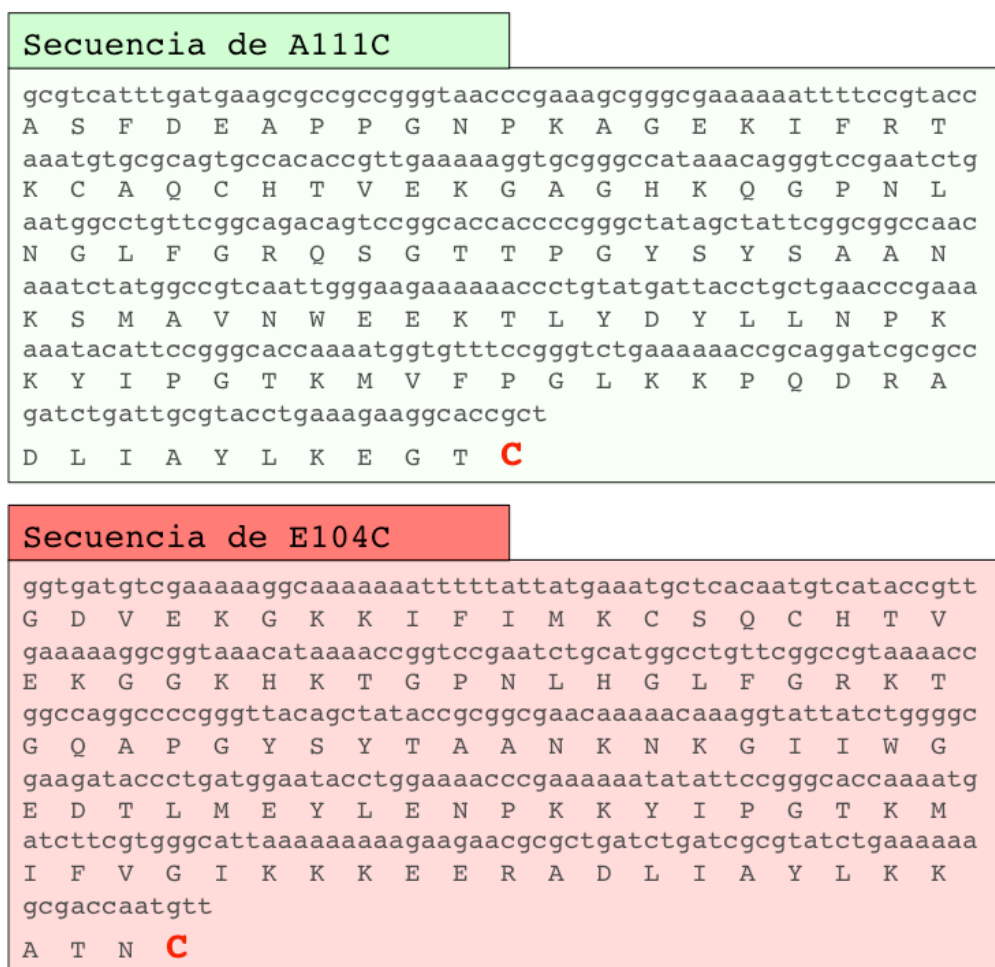
*(Arthur C. Clarke)*



### 3.1. Obtención de las Variantes E104C y A111C

#### 3.1.1. Mutagénesis Dirigida

Las variantes E104C del Cc de *H. sapiens* y A111C del Cc de *A. thaliana* se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida usando para ello los oligonucleótidos indicados anteriormente (ver apartado 2.3.1, Materiales y Métodos). La secuencia de los genes mutados fue confirmada mediante secuenciación en el CNIO, obteniendo los resultados mostrados en la figura 30.



**Figura 30. Secuenciación de las variantes E104C y A111C del Cc.** La cisteína introducida en ambos casos en el extremo carboxi-terminal se muestra resaltada en rojo.

### 3.1.2. Expresión y Purificación de las Variantes E104C y A111C

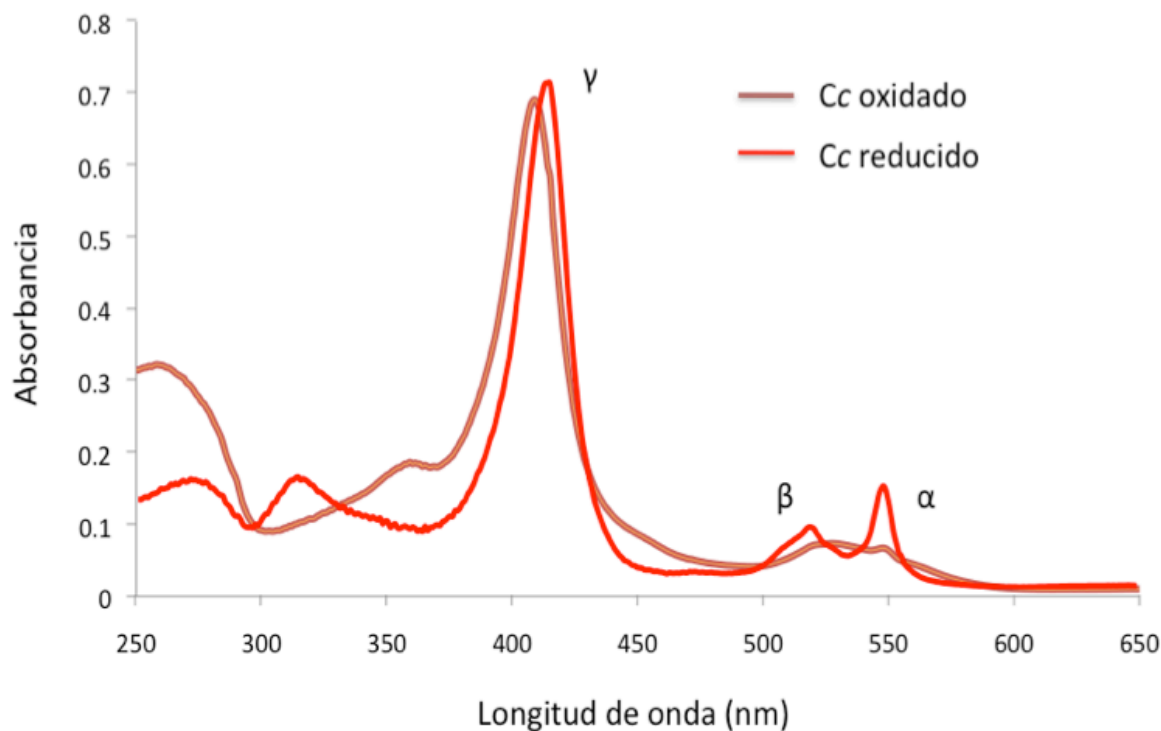
La expresión y purificación de ambas variantes de Cc, tanto E104C como A111C, se realizó tal y como se explicó anteriormente (ver apartado 2.3.2, Materiales y Métodos), usando un columna de carboximetil-celulosa, como se muestra en la figura 31.



**Figura 31. Purificación de Cc mediante cromatografía de intercambio iónico en columna de carboximetil-celulosa.** El extracto crudo procedente de células BL-21 en tampón borato 1,5 mM, pH 8,5, se cargó en una columna de carboximetil-celulosa, tras lo cual la columna se lavó con 2 volúmenes de columna. Posteriormente, la elución del Cc se realizó usando un gradiente continuo de NaCl 25-250 mM en el caso de A111C, o NaCl 36-360 mM en el caso de E104C. Finalmente, las fracciones se recogieron en volúmenes de 2-5 mL.

La pureza del Cc se determinó espectrofotométricamente como la relación entre la absorbancia a 278 nm y 549 nm, considerando como fracciones puras aquellas que presentaban una relación de absorbancia igual o menor a uno. En la figura 32 se

muestra un espectro de absorción UV-Visible típico de Cc, tanto en estado oxidado (línea de color marrón) como en estado reducido (línea de color rojo).



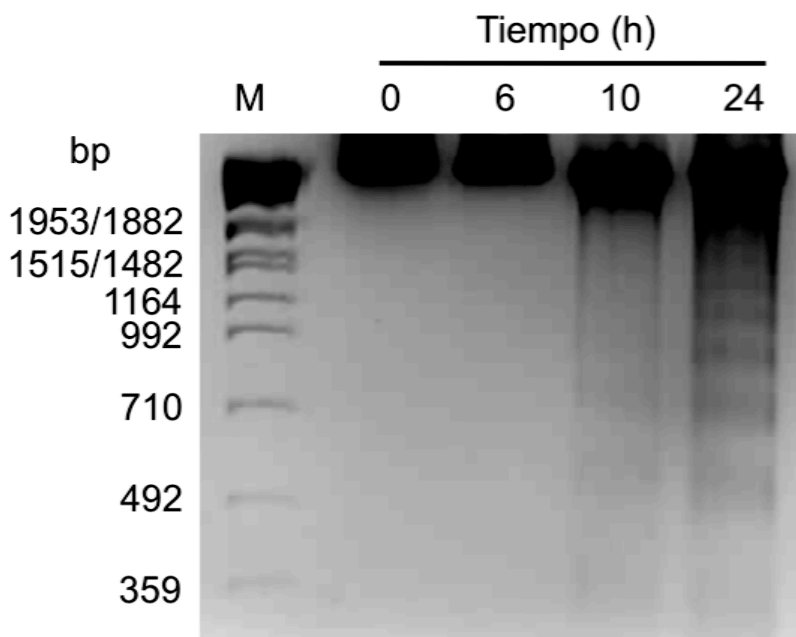
**Figura 32. Espectro de absorción UV-Visible del Cc.** Se muestra tanto su espectro en estado oxidado (línea de color marrón) como en estado reducido (línea de color rojo). Asimismo, se indican las bandas de absorción  $\alpha$  (549 nm),  $\beta$  (521 nm) y  $\gamma$  (415 nm) características del Cc.

## 3.2. Búsqueda de Nuevas Dianas del Citocromo c en la Apoptosis de Mamíferos

### 3.2.1. Inducción de Apoptosis en Células *Jurkat* Mediante CPT

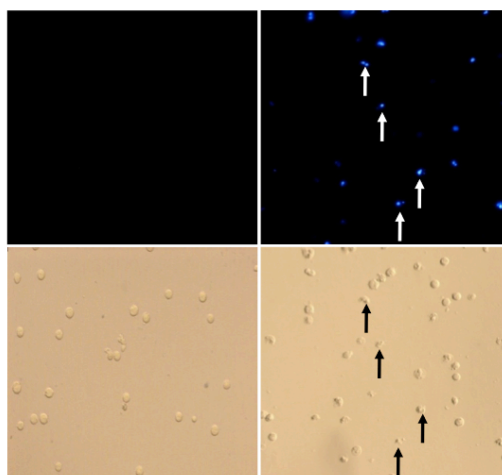
Con el objetivo de comprobar la implicación del Cc en la regulación de otras rutas de señalización durante la apoptosis, aparte de inducir la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas, comenzamos confirmando los cambios bioquímicos que se producen tras inducir apoptosis con CPT en células *Jurkat*, como ya se ha

descrito anteriormente (Johnson *et al.*, 1997). En la figura 33 se muestra la escalera de ADN, generada como consecuencia de la fragmentación oligonucleosomal característica del proceso apoptótico tras 10 h de tratamiento con CPT (ver apartado 2.4.4, Materiales y Métodos; Liu *et al.*, 1996), uno de los principales marcadores de la apoptosis.

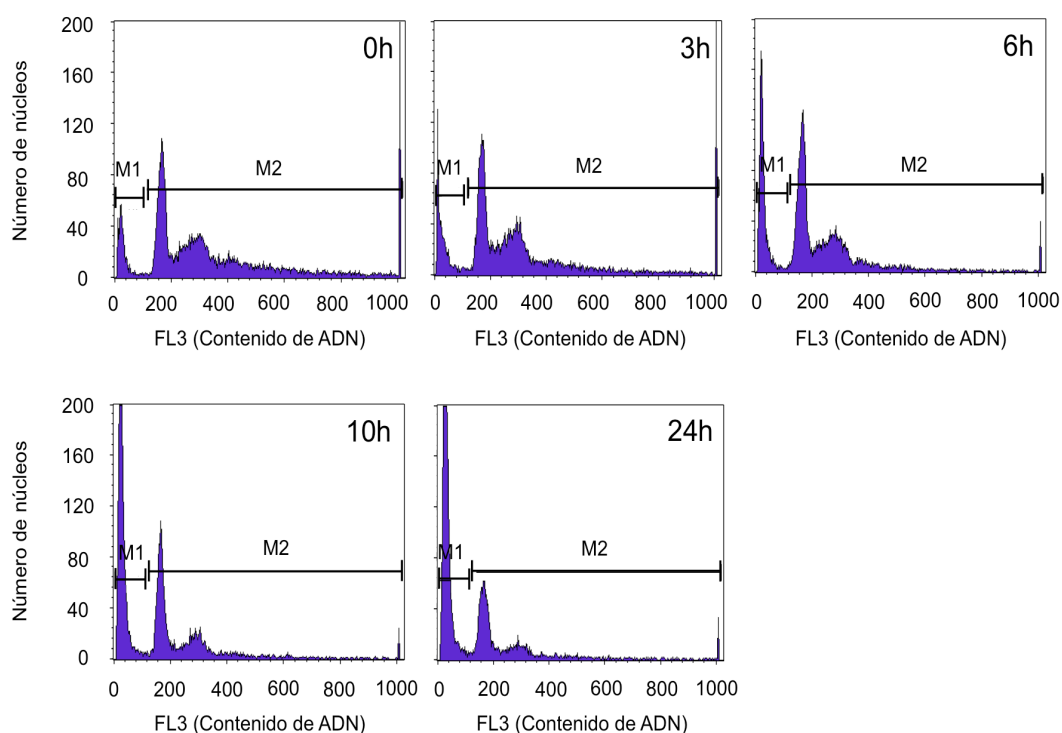


**Figura 33. Escalera de ADN en células *Jurkat* tratadas con CPT 10  $\mu$ M durante 0, 6, 10 y 24 horas.** Tras inducir apoptosis en cultivos líquidos de células *Jurkat* con CPT 10  $\mu$ M se procedió a la extracción del ADN genómico a los tiempos indicados (Liu *et al.*, 1996). El ADN genómico se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) y se tiñó con bromuro de etidio.

La ocurrencia del proceso de apoptosis se corrobora también por un aumento en la intensidad de la señal del DAPI en los núcleos de las células tratadas con CPT a lo largo del tiempo, lo que se produce como consecuencia de la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Figura 34; Zoli *et al.*, 2005). Este mismo fenómeno se aprecia como una disminución en el contenido de ADN observada mediante citometría de flujo (Figura 35).

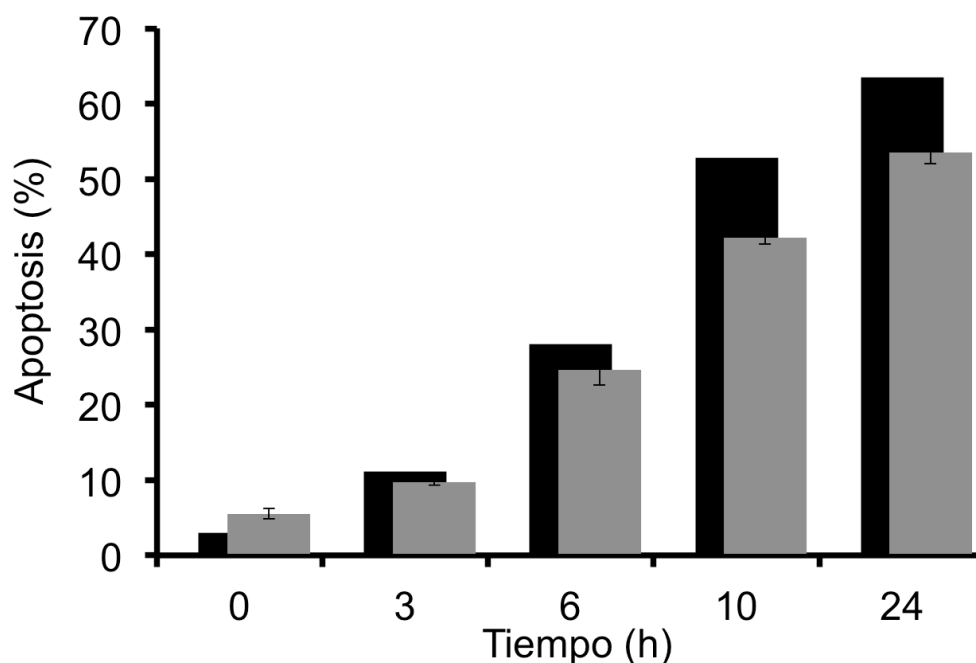


**Figura 34.** Tinción con DAPI de células *Jurkat* tratadas o no tratadas con CPT 10  $\mu$ M. La condensación del material nuclear se visualizó en cultivos de células *Jurkat* tratadas durante 24 horas (derecha) o no tratadas (izquierda) con CPT 10  $\mu$ M mediante la tinción con DAPI. Las flechas señalan células apoptóticas positivas para DAPI visualizadas mediante microscopía de fluorescencia.



**Figura 35.** Determinación del porcentaje de apoptosis en células *Jurkat* tratadas con CPT 10  $\mu$ M durante 0, 3, 6, 10 y 24 horas mediante citometría de flujo. Las células fueron fijadas en etanol al 70 % y teñidas con yoduro de propidio. M1: células apoptóticas con un contenido de ADN sub-G1; M2: corresponde a células viables.

Asimismo, el número de células apoptóticas tras el tratamiento con CPT 10  $\mu$ M fue seguido no sólo mediante citometría de flujo, sino también mediante un ensayo de viabilidad celular basado en la capacidad de la células viables para excluir activamente el azul Trypan (Figura 36). Ambas técnicas coinciden en que el número de células apoptóticas aumenta significativamente 6 horas después del tratamiento con CPT 10  $\mu$ M, demostrando que las células *Jurkat* tratadas están muriendo específicamente mediante apoptosis, y no mediante otros tipos de muerte celular como la necrosis.



**Figura 36.** Porcentaje de células *Jurkat* en apoptosis tras el tratamiento con CPT 10  $\mu$ M durante 0, 3, 6, 10 y 24 horas, determinado mediante citometría de flujo (barras negras) y azul Trypan (barras grises). Los datos de exclusión de azul Trypan representan la media de tres ensayos independientes. Por otro lado, los datos de citometría de flujo proceden de contar 10.000 células en cada medida.



### 3.2.2. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo c: Una Aproximación Proteómica

#### 3.2.2.1. Cromatografía de Afinidad

Con el objetivo de identificar nuevas dianas del Cc durante la apoptosis, las cuales nos proporcionarían un punto de partida para intentar elucidar funciones aún no exploradas del Cc durante este proceso, se empleó una aproximación proteómica combinando la cromatografía de afinidad, para la purificación de las posibles nuevas dianas del Cc, y la espectrometría de masas, para la identificación de estas dianas.

Para alcanzar este objetivo, se empleó una columna de tiol-sefarosa 4B (TS-4B), la cual une covalentemente mediante puentes disulfuro proteínas con residuos de cisteína libres y expuestos al solvente. Para ello fue necesario reemplazar mediante PCR mutagénica el glutámico en el extremo carboxi-terminal del Cc WT por una cisteína (Figura 30), obteniendo de este modo el mutante E104C (ver apartado 3.1, Resultados). Esta variante del Cc fue expresada y purificada tal y como se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Roldán *et al.*, 2006). Posteriormente, el mutante E104C se unió covalentemente a la matriz TS-4B mediante la formación de un puente disulfuro según el método descrito por Azzi *et al.* 1982 (ver apartado 2.7.1, Materiales y Métodos). Las otras dos cisteínas presentes en el Cc no interfieren en este proceso al estar implicadas en la unión covalente del hemo a la cadena polipeptídica (Allen *et al.*, 2002). Igualmente, se preparó una columna TS-4B control sin Cc (Figura 37).

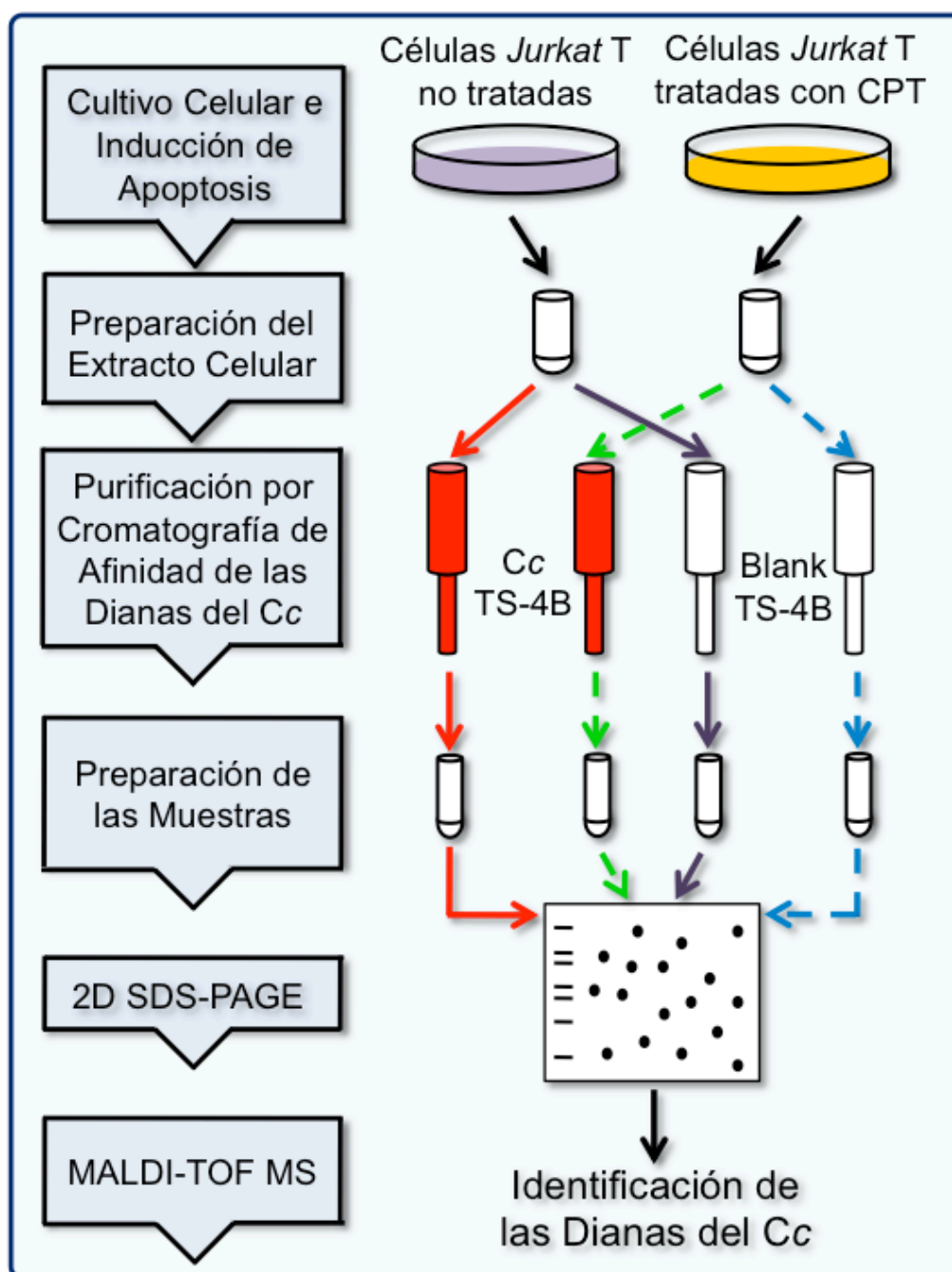


**Figura 37.** Columnas de tiol-sefarosa 4B usadas para la cromatografía de afinidad. A la izquierda, columna control (sin Cc); a la derecha, columna con Cc E104C unido.

Los extractos celulares fueron obtenidos a partir de cultivos en suspensión de células *Jurkat* mantenidos en RPMI 1640 con una densidad celular de  $0.15\text{-}1.5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Los extractos de células apoptóticas fueron preparados a partir de cultivos de células *Jurkat* en las que, previamente, se había inducido apoptosis con CPT  $10 \mu\text{M}$  (Johnson *et al.*, 1997), recogiendo las células 6 h después del tratamiento con CPT, momento en el que se ha descrito que el Cc ya ha sido liberado desde la mitocondria hacia el citosol (Goldstein *et al.*, 2005). Dado que la citometría de flujo y el ensayo de exclusión de azul Trypan indican tan sólo un 30 % de células apoptóticas en cultivos de células *Jurkat* 6 horas después de inducir apoptosis con CPT  $10 \mu\text{M}$ , los resultados inferidos a partir de nuestros datos hacen referencia a eventos apoptóticos tempranos (Figuras 33 a 36).

Los extractos de células *Jurkat* tratadas o no tratadas con CPT fueron cargados en paralelo bien en la columna con Cc unido (Cc TS-4B) o bien en la columna sin Cc (columna blanco). Las posibles dianas del Cc fueron eluidas de la columna Cc TS-4B aumentando la fuerza iónica, mientras que las proteínas obtenidas de la columna blanco fueron usadas como control de unión inespecífica. Las fracciones proteicas

resultantes fueron preparadas para su posterior análisis mediante electroforesis bidimensional siguiendo el método presentado en la Figura 38.

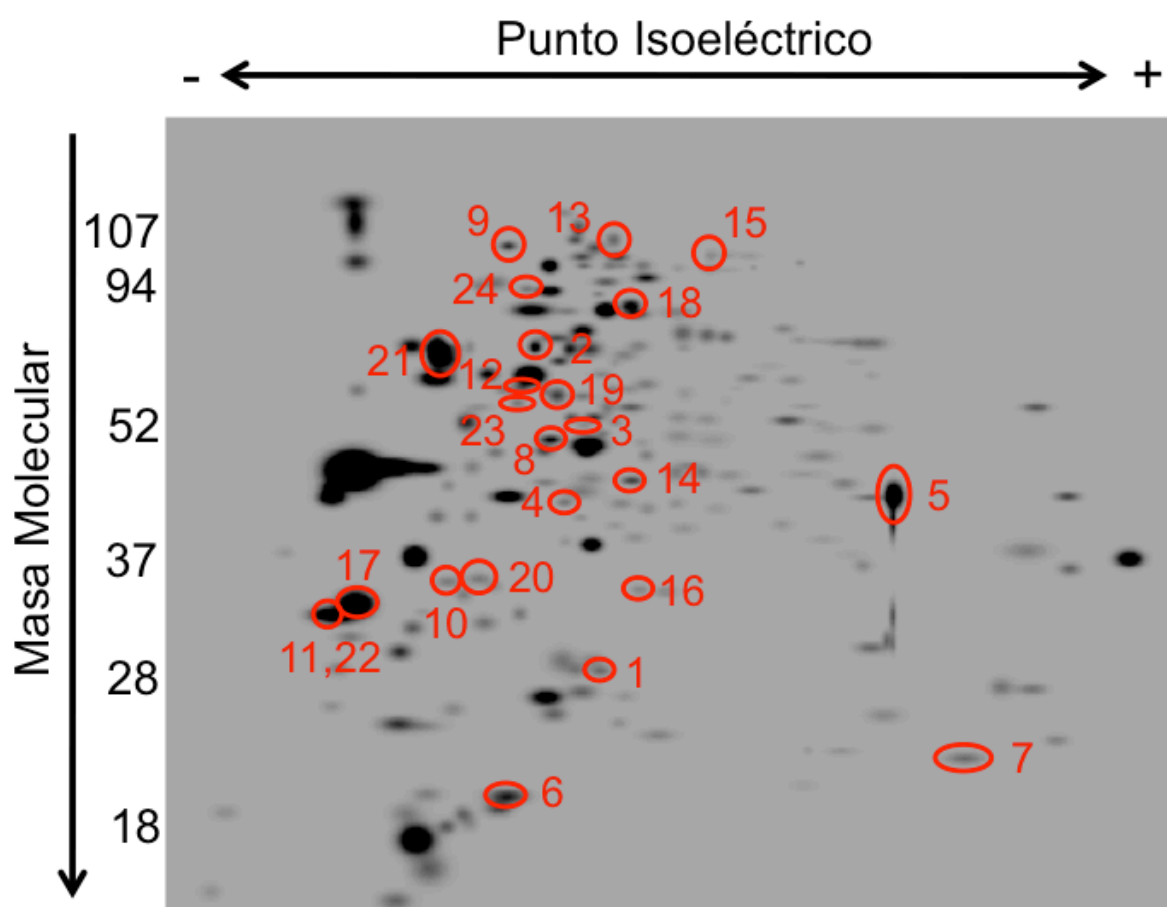


**Figura 38. Identificación de nuevas dianas del Cc de *H. sapiens*.** Aproximación empleada para la purificación de las dianas del Cc mediante cromatografía de afinidad y su posterior análisis por medio de 2D SDS-PAGE y espectrometría de masas.

### 3.2.2.2. Electroforesis 2D SDS-PAGE

La cromatografía de afinidad dió lugar a cuatro tipos de muestras diferentes, en función de las condiciones experimentales utilizadas: i) proteínas procedentes de células no tratadas con CPT 10  $\mu$ M purificadas usando la columna blanco desprovista de Cc, ii) proteínas procedentes de células tratadas con CPT 10  $\mu$ M purificadas usando una columna blanco, iii) proteínas procedentes de células no tratadas con CPT 10  $\mu$ M purificadas usando una columna Cc TS-4B y iv) proteínas procedentes de células tratadas con CPT 10  $\mu$ M purificadas con una columna Cc TS-4B (Figura 38). Los cuatro tipos de muestras fueron liofilizadas por separado, y la mezcla de proteínas presente en cada muestra fue resuelta mediante electroforesis bidimensional de acuerdo a la masa molecular y punto isoeléctrico de cada proteína (ver apartado 2.8.1, Materiales y Métodos). Los geles resultantes fueron analizados con el software PDQuest versión 8 (BioRad).

Finalmente, aquellas manchas que aparecían en la condición iv, o tanto en la condición iv como en la iii, pero no en los controles, condiciones i y ii, las cuales aparecen señaladas en el “master gel” (Figura 39), fueron recortadas usando para ello puntas de pipeta, analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/MS e identificadas a través de la búsqueda de los péptidos resultantes de la digestión de las manchas en la base de datos UniProtKB-SwissProt v57.7, usando una licencia local de MASCOT 2.1 a través del Servidor Global de Proteínas v 3.6 (Applied Biosystems) (ver apartados 2.8.2, 2.8.3 y 2.8.4, Materiales y Métodos).



**Figura 39.** Imagen del “master gel” en la que se indican las proteínas que interaccionan con el Cc en condiciones apoptóticas, o tanto en condiciones apoptóticas como homeostáticas. En la imagen se muestra el resultado de la combinación de todos los geles analizados. Estas proteínas diferenciales fueron extraídas del gel y analizadas mediante espectrometría de masas. Los números se corresponden con los presentes en la Tabla 1.

Sólo aquellas proteínas presentes exclusivamente en extractos celulares tratados con CPT 10  $\mu$ M o en ambos, tratados o no tratados con CPT, obtenidas con la columna con E104C unido fueron analizadas. Las proteínas identificadas mediante este análisis como posibles dianas del Cc se encuentran esquematizadas en la Tabla 10.

Tabla 10. Dianas del Cc de *H. sapiens* mediante cromatografía de afinidad y MALDI-TOF/MS

Nº mancha	Nombre de la proteína	Gen	NCBI	SC %	Puntuación	Localización	MW(kDa)/pI	Horas
1	Casein kinase II subunit beta	CSNKIIβ	gi54037520	16	81	Citoplasma	24,9/5,33	0-6
2	Chaperonin containing TCP1 subunit 2	CCT2	gi545360	33	65		60,3/5,80	0-6
3	Coronin-like protein	CORO1A	gi1002923	19	118		51,0/6,25	6
4	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha	eIF2α	gi4758256	40	134		36,0/5,02	0-6
5	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase A	ALDOA	gi4557976	46	190		39,4/8,30	0-6
6	Parvalbumin	PVALB	gi169158851	38	71		12,0/4,98	6
7	Ribosomal protein S7	RPS7	gi337518	22	107		22,1/10,09	6
8	Tubulin beta chain	TUBB	gi49456871	26	74		49,7/4,78	0-6
9	Tumor rejection antigen 1	HSP90B1	gi62088648	15	127	Núcleo	92,5/4,76	0-6
10	14-3-3 epsilon	YWHAE	gi119611035	44	111		29,2/4,63	6
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2	hnRNP C1/C2	gi119586801	21	146		32,3/5,00	6
12	Histone-binding protein RBBP7	RBBP7	gi49456363	10	139		47,8/4,89	6
13	Minichromosome maintenance complex 6	MCM6	gi1197363	13	95		92,9/5,29	6
14	Minichromosome maintenance complex 7	MCM7	gi253735647	15	119		44,6/5,93	0-6
15	Prospero homeobox 1	PROX1	gi7706322	45	83		83,2/6,74	6
16	SET nuclear oncogene	SET	gi338039	22	82		32,0/4,12	6
17	Acidic nuclear phosphoprotein 32B	ANP32B	gi171848685	60	176	Núcleo Citoplasma	28,2/3,94	0-6
18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	hnRNPL	gi119577230	9	71		64,1/8,46	6
19	Nucleolin	NCL	gi119591368	16	172		50,9/4,95	0-6
20	Nucleophosmin	NPM	gi114762	4	91		32,6/4,64	6
21	Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	gi119622937	22	80		42,8/4,60	6
22	Ser/Thr kinase receptor-associated protein	STRAP	gi74996777	5	90		38,5/4,98	6
23	ATP synthase subunit beta	ATP5β	gi89574029	30	108	Mitocondria	56,6/5,26	0-6
24	Heat shock 70 kDa protein	HSPA5	gi386758	29	164	ER, Citoplasma	72,4/5,07	6

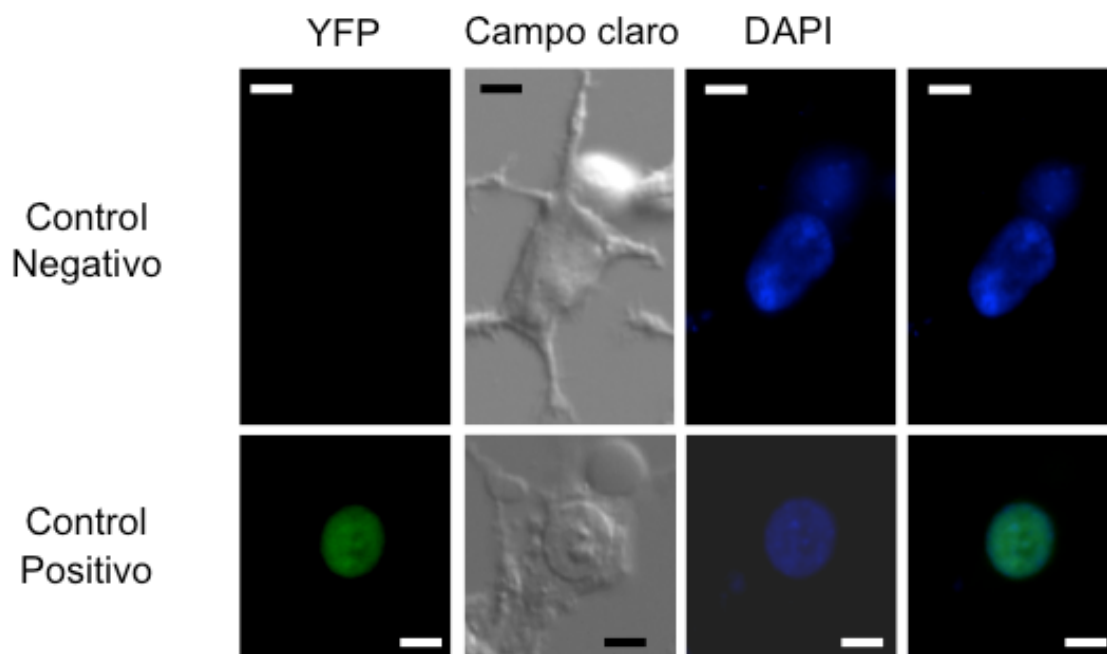
### 3.2.3. Verificación *in vivo* de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas Mediante BiFC

#### 3.2.3.1. Generalidades

El BiFC es una técnica que permite el análisis de las interacciones proteína-proteína en su contexto biológico, al mismo tiempo que permite obtener información acerca de la localización donde se producen estas interacciones en células vivas (Kerppola, 2006). Para ello, el Cc y sus nuevas dianas – previamente identificadas mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masas – fueron fusionadas con el fragmento carboxi-terminal de la proteína fluorescente amarilla (CYFP) o con el fragmento amino-terminal (NYFP), respectivamente. En todos los casos, el Cc y sus posibles dianas fueron clonadas justo delante del fragmento de la YFP. El estudio de la interacción se realizó en células HEK293T, las cuales fueron transfectadas con el Cc y sus diferentes dianas, siguiendo la interacción a través de la reconstitución de la fluorescencia de la YFP.

Se ha descrito que los fragmentos de la YFP son capaces de reconstituir por sí solos a la YFP con baja eficiencia, dando lugar a complejos fluorescentes, incluso en ausencia de una interacción específica (Kerppola, 2006). Por eso, para asegurarnos de que la interacción observada no es resultado de una complementación espontánea de la YFP, se realizaron una serie de controles. El control más apropiado para los ensayos de BiFC está basado en la expresión de dos proteínas de fusión que, aún expresándose en el mismo compartimento, no interaccionan, de modo que impiden la reconstitución eficiente de la YFP. Por esa razón, como control positivo hemos usado los

vectores *pBiFC-bFosYC155* y *pBiFC-bJunYN155*, mientras que los vectores *pBiFC-bFosΔZIPYC155* y *pBiFC-bJunYN155* fueron usados como control negativo (Hu *et al.*, 2002) (Figura 40).



**Figura 40. Control positivo (*pBiFC-bFocYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) y control negativo (*pBiFC-bFosΔZIPYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) empleados en los experimentos de BiFC.** A la izquierda se muestra la señal debida a la reconstitución de la YFP, a continuación la célula en campo visible y el núcleo visualizado en azul mediante la tinción con DAPI. Finalmente, a la derecha se muestra la superposición de la señal de la YFP + DAPI. La escala representa 5  $\mu$ m.

### 3.2.3.2. Obtención de las Proteínas de Fusión

Tanto el cDNA del Cc humano como los cDNAs disponibles de las dianas del Cc (17 de las 24 identificadas mediante proteómica, ver más adelante) fueron compradas a Source BioScience. El cDNA del Cc fue clonado en un vector conteniendo la CYFP, mientras que las dianas del Cc fueron clonadas en el vector conteniendo la NYFP (Gandía *et al.*, 2008). Los oligonucleótidos que aparecen en la tabla 5 (ver apartado 2.9.1, Materiales y Métodos) fueron



diseñados para la amplificación mediante PCR de los distintos cDNAs, introduciendo los sitios de restricción apropiados para la posterior clonación en los vectores anteriormente mencionados. En la figura 27 (ver apartado 2.9.1, Materiales y Métodos) se muestra un esquema de las construcciones empleadas para los ensayos de BiFC.

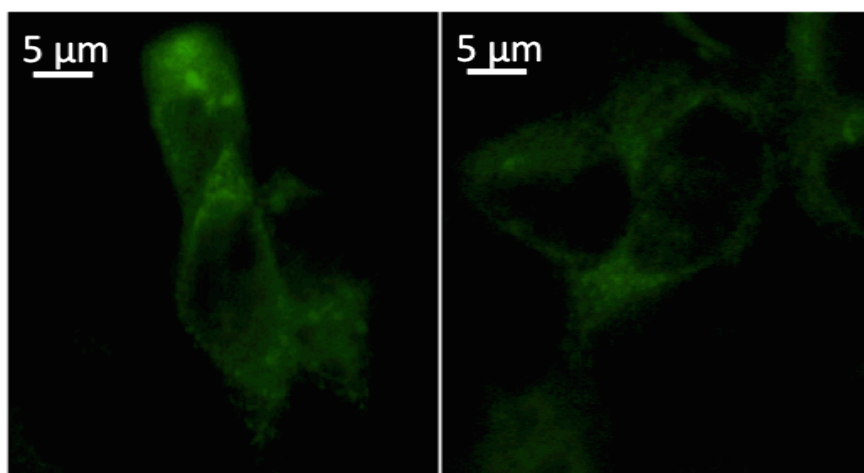
De las 24 dianas identificadas mediante proteómica, 7 no fueron analizadas mediante BiFC. Esto se debe a que cuatro de estas dianas no han sido descritas en la literatura como proteínas relacionadas con la apoptosis, concretamente NAP1L4, ATP5 $\beta$ , CCT2 y RPS7. En el caso de hnRNP L el cDNA no estaba disponible en las bases de datos, y respecto a RBBP7, aunque el cDNA fue adquirido de Source BioScience, éste no pudo ser amplificado mediante PCR.

Respecto a Hsp90B1, se descartó para estudios posteriores, ya que previamente se había descrito que interacciona con APAF1 y no con el Cc, aunque pueden ser purificadas conjuntamente como un complejo ternario (Hsp90B1-APAF1-Cc) (Pandey *et al.*, 2000). Esto indica que nuestra aproximación proteómica es apropiada para la identificación de dianas del Cc, ya estén interaccionando directamente con el Cc o mediante la formación de complejos ternarios.

### **3.2.3.3. Localización Subcelular del Citocromo c**

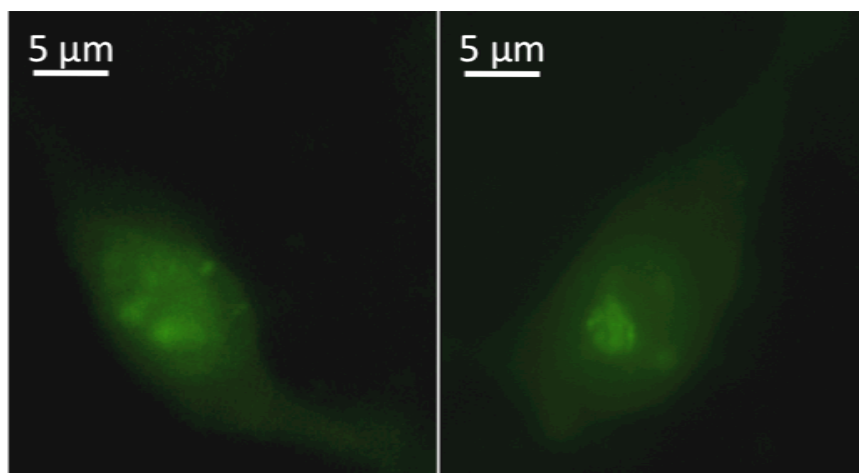
Resulta importante mencionar que el Cc, una vez expresado en el citoplasma celular, necesita ser translocado a la mitocondria, donde la hemoliasa de Cc se encarga de incorporar el grupo hemo, formándose la holoenzima correctamente plegada. En condiciones homeostáticas, las células HEK293T, las cuales

fueron transfectadas con los vectores Cc-CYFP y el vector *pNYFP* vacío (Figura 41) muestran un patrón punteado de fluorescencia para la distribución del Cc, lo que pone de manifiesto su localización mitocondrial, tal y como se ha descrito anteriormente (Goldstein et al., 2005).

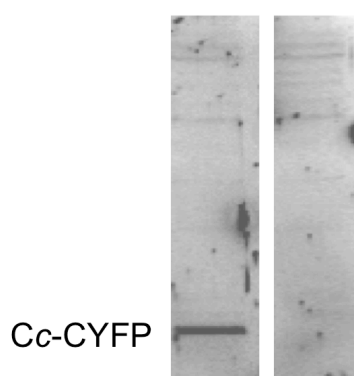


**Figura 41. Localización mitocondrial del Cc en condiciones homeostáticas observada mediante BiFC.** Las células HEK293T se transfectaron con la construcción Cc-CYFP y el vector *pNYFP* vacío, y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia con el objetivo de determinar la localización del Cc por medio de la reconstitución de la YFP. Se muestran dos ejemplos de localización mitocondrial de Cc.

Tras tratar las células con CPT, el patrón de fluorescencia pasaba de ser punteado a difuso, consistente con la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol (Figura 42). La expresión de la proteína de fusión Cc-CYFP fue confirmada por medio de Western blot, usando para ello un anticuerpo policlonal de conejo contra la EGFP (Figura 43).



**Figura 42. Localización citoplásmica del Cc en condiciones apoptóticas observada mediante BiFC.** Las células HEK293T transfectadas con la construcción Cc-CYFP y el vector pNYFP vacío fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y 6 h después visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran dos ejemplos de localización citoplásmica de Cc.

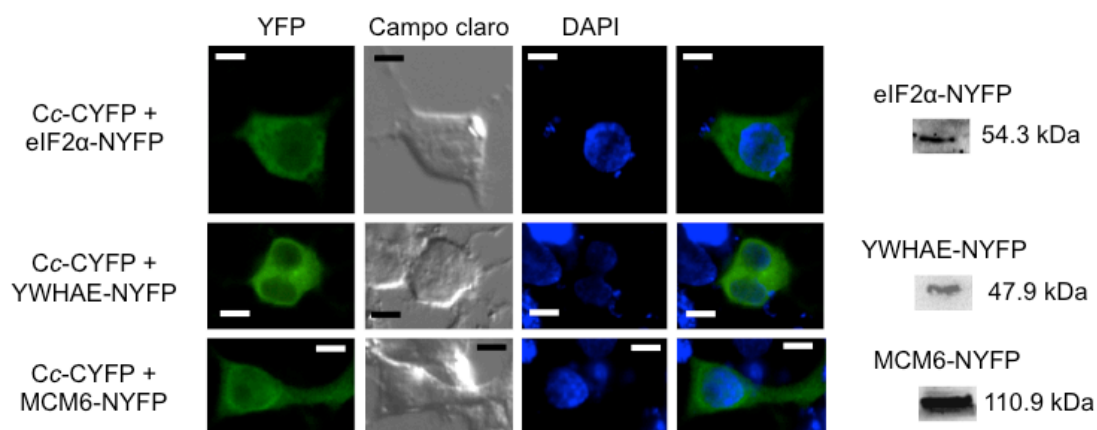


**Figura 43. Expresión de Cc-CYFP determinada mediante Western blot.** La expresión de la construcción Cc-CYFP se determinó usando un anticuerpo anti-EGFP, mostrando una banda a 22.5 kDa, masa molecular esperada para la proteína de fusión Cc-CYFP. A la izquierda se muestra el western blot de extractos totales de células HEK293T transfectadas con la construcción Cc-CYFP, mientras que a la izquierda se muestra el western blot de células HEK293T no transfectadas.

#### 3.2.3.4. Análisis *in vivo* de las Interacciones

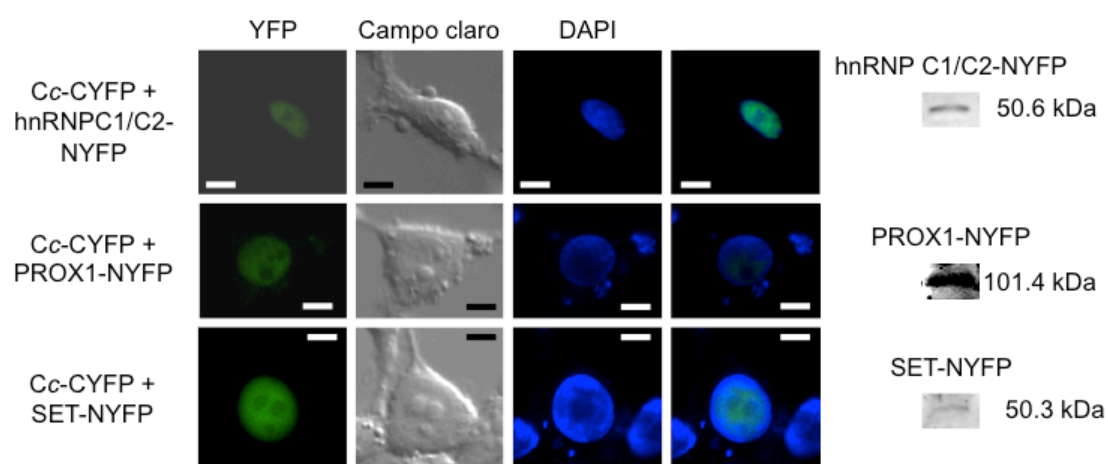
Como se ha explicado anteriormente, los ensayos *in vivo* de la interacción del Cc con sus nuevas dianas mediante BiFC se realizaron en 17 de las 24

posibles dianas identificadas por medio del análisis proteómico. Asimismo, la expresión transitoria de las dianas del Cc fusionadas a la NYFP en los ensayos de BiFC fue comprobada por medio de Western blot, usando para ello un anticuerpo policlonal de conejo contra la EGFP (ver apartado 2.10, Materiales y Métodos). Como se aprecia en las figuras 44-48, todas las construcciones dieron una banda con la masa molecular esperada para las distintas construcciones, indicando que éstas se expresan correctamente. Con la excepción de las proteínas CSNKII $\beta$ , CORO1A, TUBB y MCM7, se pudo confirmar la interacción *in vivo* entre el Cc y las 13 dianas restantes. Algunas de estas interacciones fueron detectadas en el citoplasma, concretamente aquellas que implicaban a las proteínas eIF2 $\alpha$ , YWHAE y MCM6 (Figura 44).



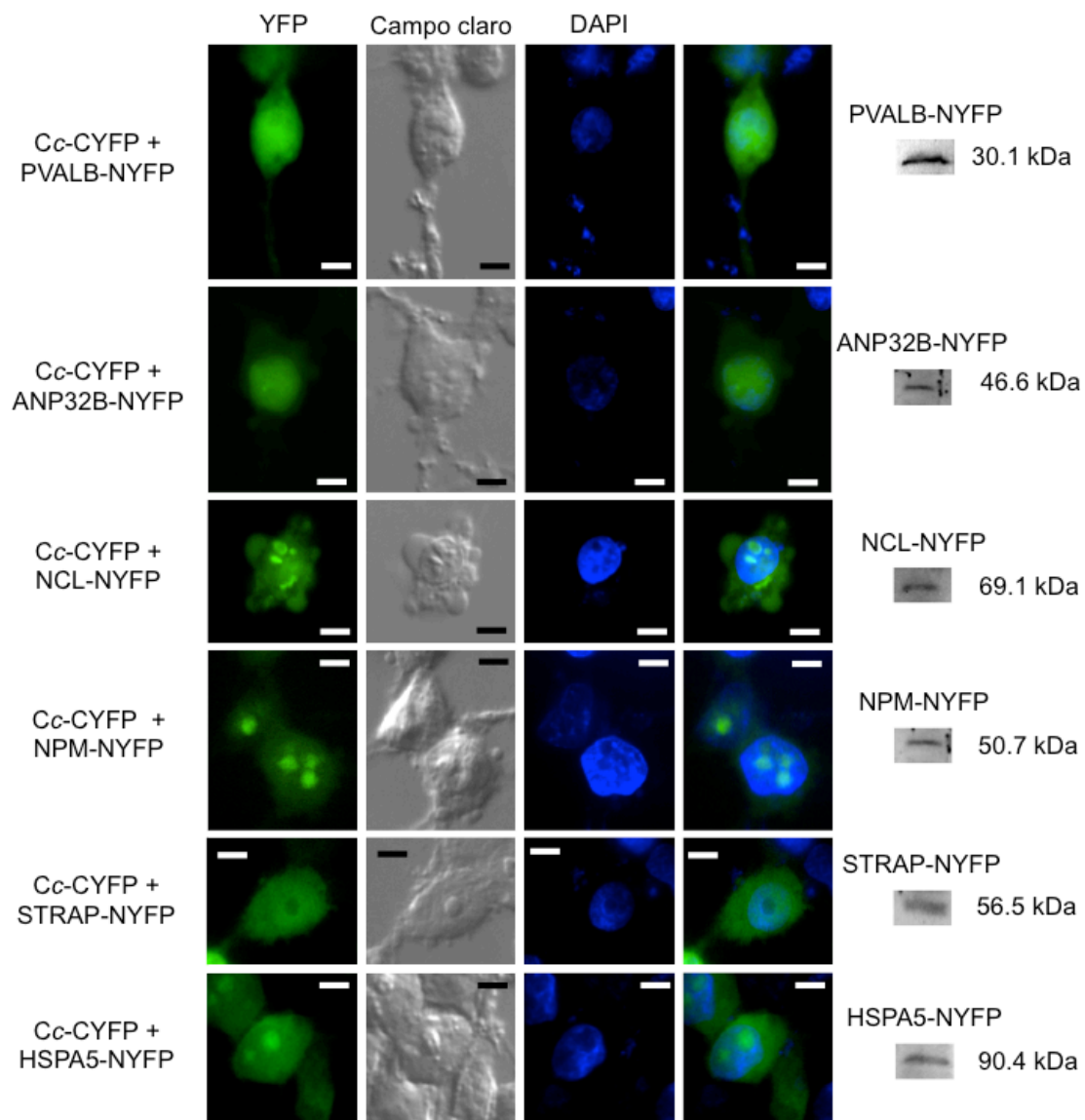
**Figura 44. Localización citoplásmica de las interacciones establecidas entre el Cc y eIF2 $\alpha$ , YWHAE o MCM6 analizadas por BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones indicadas fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 h después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante Western blot. La escala representa 5  $\mu$ m. Ver Figura 40 para más detalles.

En cambio, otras (hnRNP C1/C2, PROX1 and SET) dan una señal para la reconstitución de la YFP que solapa con la señal nuclear del DAPI, lo que indica que la interacción se produce en el núcleo (Figura 45).



**Figura 45. Localización nuclear de las interacciones establecidas entre el Cc y hnRNP C1/C2, PROX1 o SET analizadas por BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones indicadas fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 h después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante Western blot. La escala representa 5  $\mu$ m. Ver Figura 40 para una explicación más detallada.

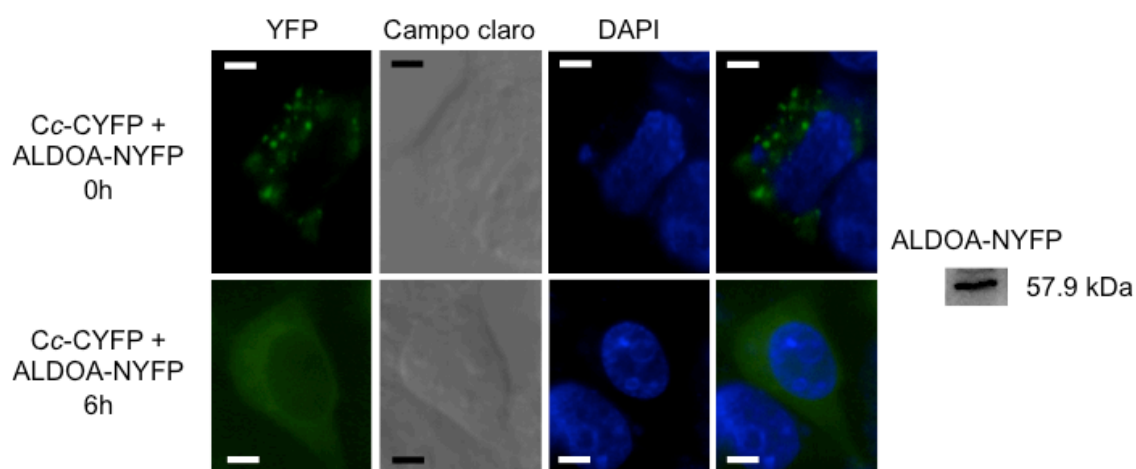
Interesantemente, el resto de los complejos formados por el Cc de *Homo sapiens* analizados mediante BiFC (ANP32B-Cc, NPM-Cc, NCL-Cc, PVALB-Cc, STRAP-Cc y HSPA5-Cc) presentan una localización núcleo-citoplásmica (Figura 46).



**Figura 46. Localización núcleo-citoplásmica de los complejos entre Cc y PVALB, ANP32B, NCL, NPM, STRAP o HSPA5 analizadas por BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones indicadas fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 h después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante Western blot. La escala representa 5  $\mu$ m. Ver Figura 40 para más detalles.

Por otro lado, se ha descrito que ALDOA cambia su localización celular dependiendo de las condiciones celulares. Así, es importante tener en cuenta que la translocación mitocondrial de la ALDOA ya ha sido descrita previamente

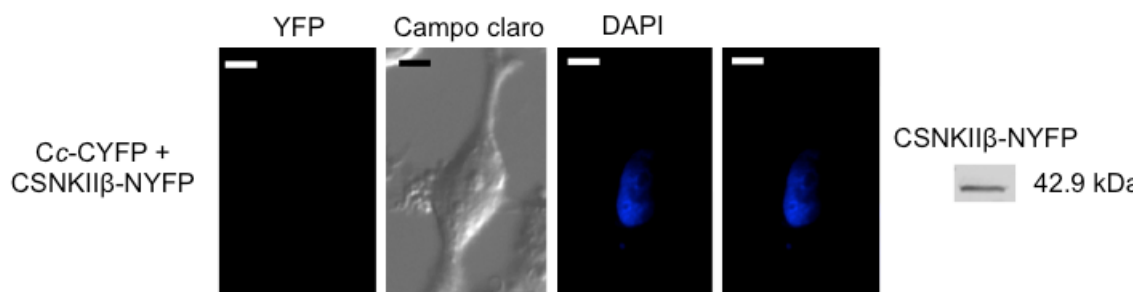
(Dukes *et al.*, 2008). Así, antes de inducir apoptosis con CPT 10  $\mu$ M la fluorescencia de la YFP, resultado de la interacción de ALDOA-Cc, presentaba un patrón punteado, lo que indica que la interacción ALDOA-Cc se produce en el interior de la mitocondria (Goldstein *et al.*, 2005). Sin embargo, durante la apoptosis, la distribución de la fluorescencia de la YFP se extendía por todo el citoplasma, lo que indica la liberación del Cc en el citosol (Figura 47).



**Figura 47. Localización mitocondrial (0 horas) o citoplásmica (6 horas) de la interacción entre el Cc y ALDOA determinada por BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M (línea inferior) o no tratadas con CPT 10  $\mu$ M (línea superior), y analizadas 6 h después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante Western blot. La escala representa 5  $\mu$ m. Ver Figura 40 para más detalles.

La ausencia de interacción entre Cc y CSNKII $\beta$ , inferida a partir de la ausencia de reconstitución de la YFP, es mostrada en la figura 48. Es importante tener en cuenta que la interacción *in vitro* entre la CSNKII $\beta$  y el Cc fue descrita *in vitro* en los años 70 (Yoshimura *et al.*, 1979), aunque nosotros no pudimos detectarla *in vivo* mediante BiFC. Por lo tanto, la incapacidad para reproducir *in*

cell la interacción Cc-CSNKII $\beta$  mediante BiFC constituye un excelente control negativo para interacciones inespecíficas.



**Figura 48. Control negativo de la interacción *in vivo* entre el Cc y CSNKII $\beta$ .** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 h después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda de la expresión de la proteína de fusión determinada mediante Western blot. La escala representa 5  $\mu$ m. Ver Figura 40 para una explicación más detallada.

### 3.2.4. Análisis *in silico* de los Complejos Formados entre el Citocromo c y sus Nuevas Dianas

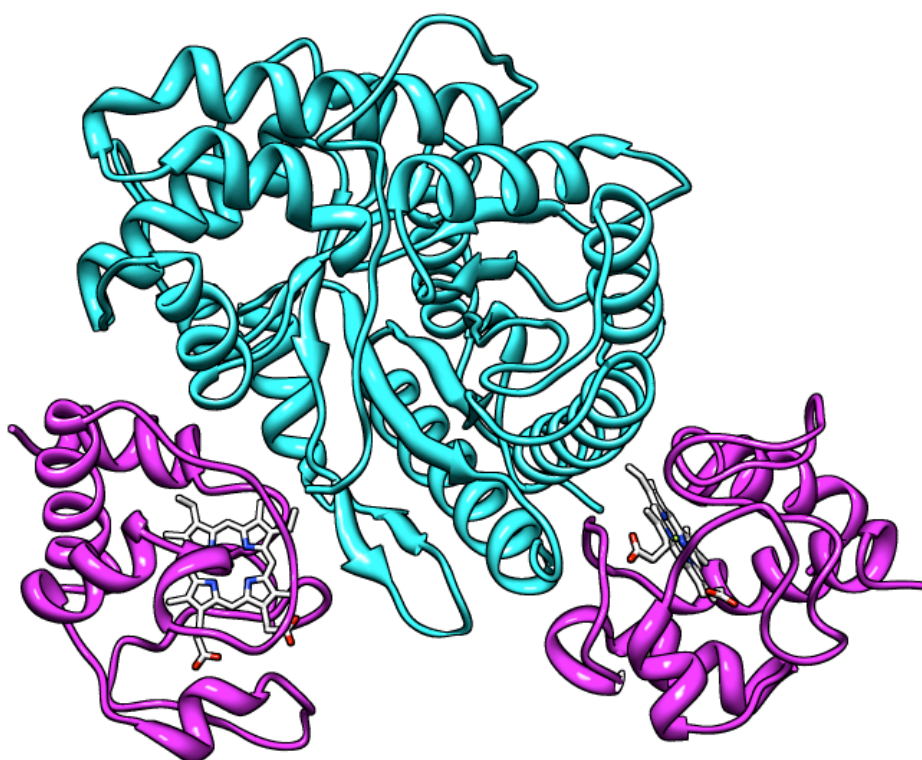
#### 3.2.4.1. Generalidades

La disponibilidad de los archivos de estructura para dos proteínas que se sabe que interaccionan nos permite modelar la posible estructura tridimensional del complejo mediante el uso de algoritmos de DOCKING (Mintseris *et al.*, 2005). Con el objetivo de identificar la superficie del Cc implicada en la interacción con aquellas dianas cuyo archivo de estructura estuviera depositado en el PDB, se empleó un algoritmo de DOCKING denominado BiGGER (ver apartado 2.11, Materiales y Metodos) (del inglés, **B**iomolecular **C**omplex **G**eneration with **G**lobal **E**valuation and **R**anking; Palma *et al.*, 2000).



### 3.2.4.2. Complejo Citocromo c - ALDOA

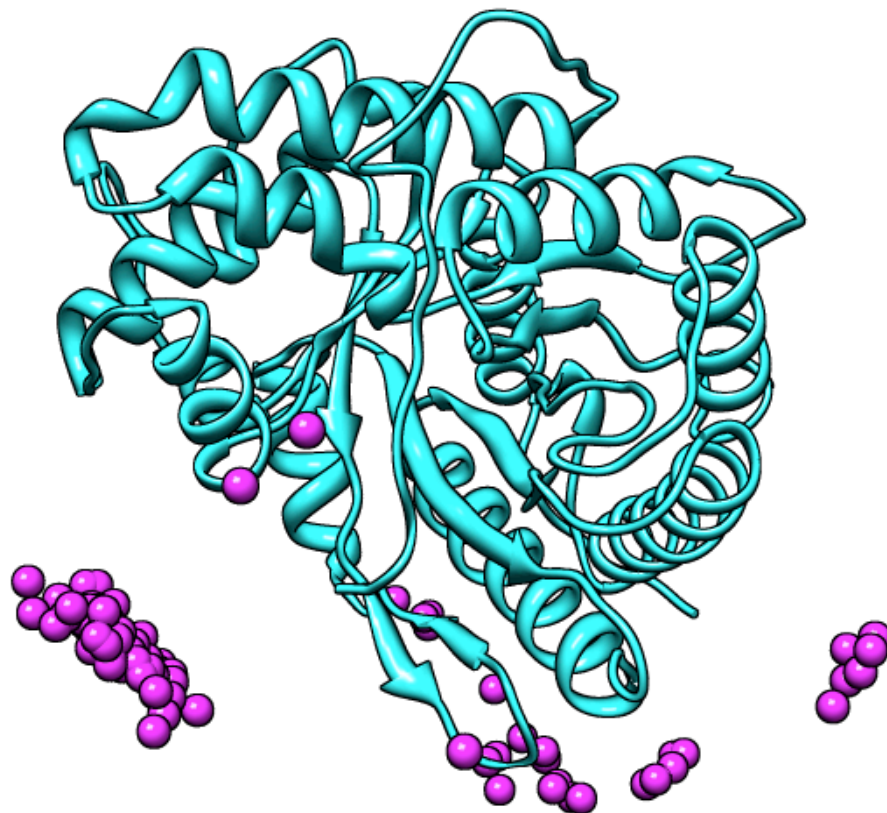
Los archivos de estructura usados para analizar mediante DOCKING el posible complejo entre el Cc y la ALDOA fueron 1J3S en el caso de Cc y 4ALD en el caso de ALDOA. Los resultados del DOCKING muestran como en la superficie de la ALDOA existen, al menos, dos zonas que son exploradas por el Cc, como se muestra en la figura 49.



**Figura 49. Complejo formado por el Cc y la ALDOA, determinado mediante técnicas de DOCKING.** El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la ALDOA se representa en celeste. Se observa como dos moléculas de Cc interaccionan con la ALDOA a través de la zona en torno al grupo hemo.

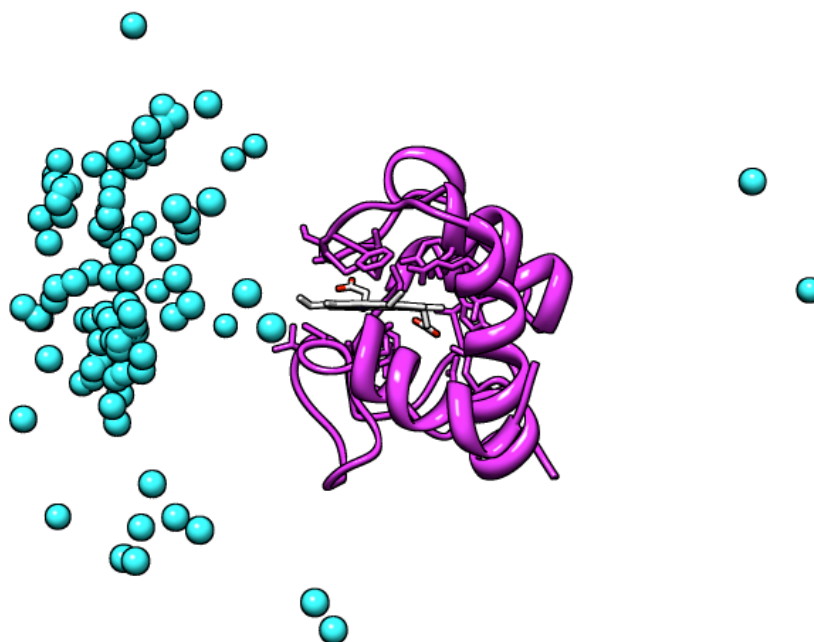
En la figura 50 se muestra la distribución de los centros de masa del Cc sobre la estructura de la ALDOA, usando para ello los 100 complejos con mejor

puntuación global determinados mediante DOCKING, mostrando que el Cc explora preferencialmente dos zonas en la superficie de la ALDOA.



**Figura 50. Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-ALDOA.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global obtenidos por DOCKING. El Cc aparece representado en magenta y ALDOA en celeste.

Por su parte, en la figura 51 se muestra la distribución de los centros de masa de la ALDOA con respecto al Cc, usando para ello los 100 complejos determinados *in silico* mediante técnicas de DOCKING con mejor puntuación global. La distribución de los centros de masa de la ALDOA sobre el Cc muestran una única zona de interacción en la superficie del Cc, que coincide con la zona que se localiza en torno al grupo hemo.

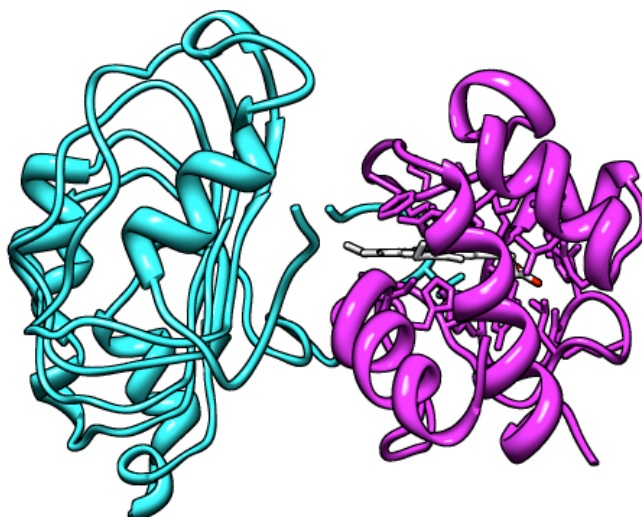


**Figura 51. Representación de los centros de masa de la ALDOA en el complejo Cc-ALDOA.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global obtenidos por DOCKING. El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la ALDOA en celeste.

### 3.2.4.3. Complejo Citocromo c - ANP32B

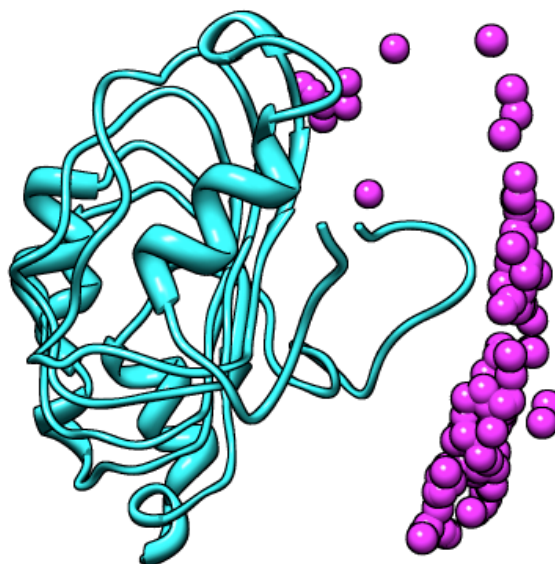
Para el estudio del complejo entre el Cc y la ANP32B, se empleó un modelo de homología para la proteína ANP32B basado en el archivo de estructura de ANP32A (2J30), para lo que se empleó el programa MODELLER. El complejo obtenido *in silico* mediante técnicas de DOCKING con mejor puntuación global se muestra en la figura 52.

En este complejo, al igual que sucedió en el complejo ALDOA-Cc, la interacción del Cc con ANP32B se produce nuevamente a través de la zona que se localiza en torno al grupo hemo, como se puede apreciar en la figura 52, coincidiendo con la misma zona de interacción que el Cc emplea en su interacciones de transferencia de electrones (Ubbink y Bendall, 1997; König *et al.*, 1980).

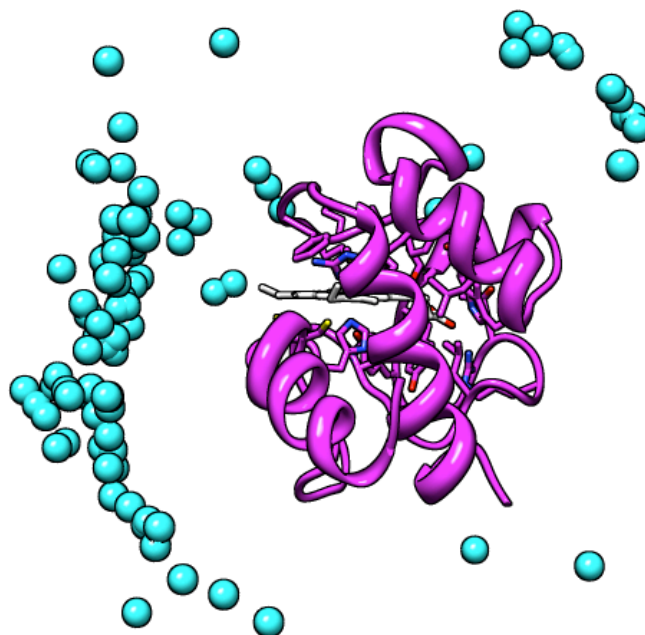


**Figura 52. Complejo formado por el Cc y la ANP32B, determinado mediante técnicas de DOCKING.** El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la ANP32B se representa en celeste.

De igual manera se analizó la distribución de centros de masa del Cc respecto a la ANP32B y viceversa, usando para ello los 100 modelos con mejor puntuación global, obteniendo los resultados mostrados en las figuras 53 y 54.



**Figura 53. Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-ANP32B.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global obtenidos por DOCKING. El Cc aparece en magenta y la ANP32B en celeste.

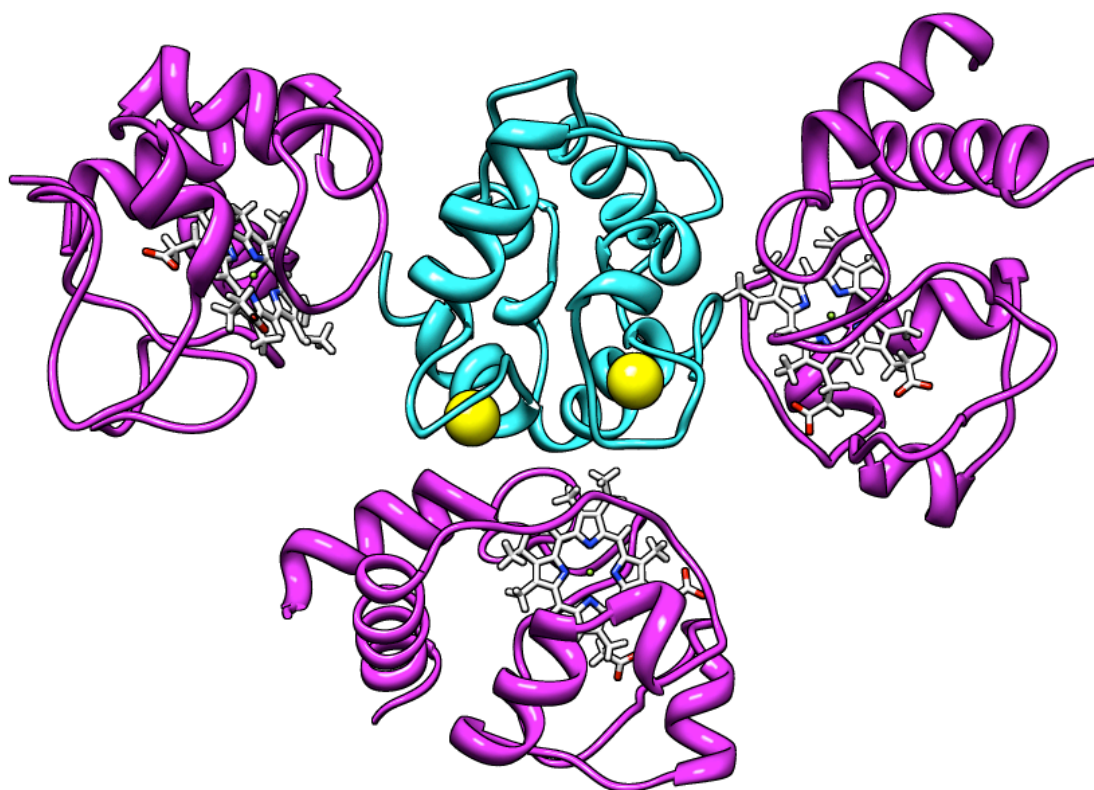


**Figura 54. Representación de los centros de masa de la ANP32B en el complejo Cc-ANP32B.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global obtenidos mediante técnicas de DOCKING. El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la ANP32B aparece en celeste.

#### 3.2.4.4. Complejo Citocromo *c* - PVALB

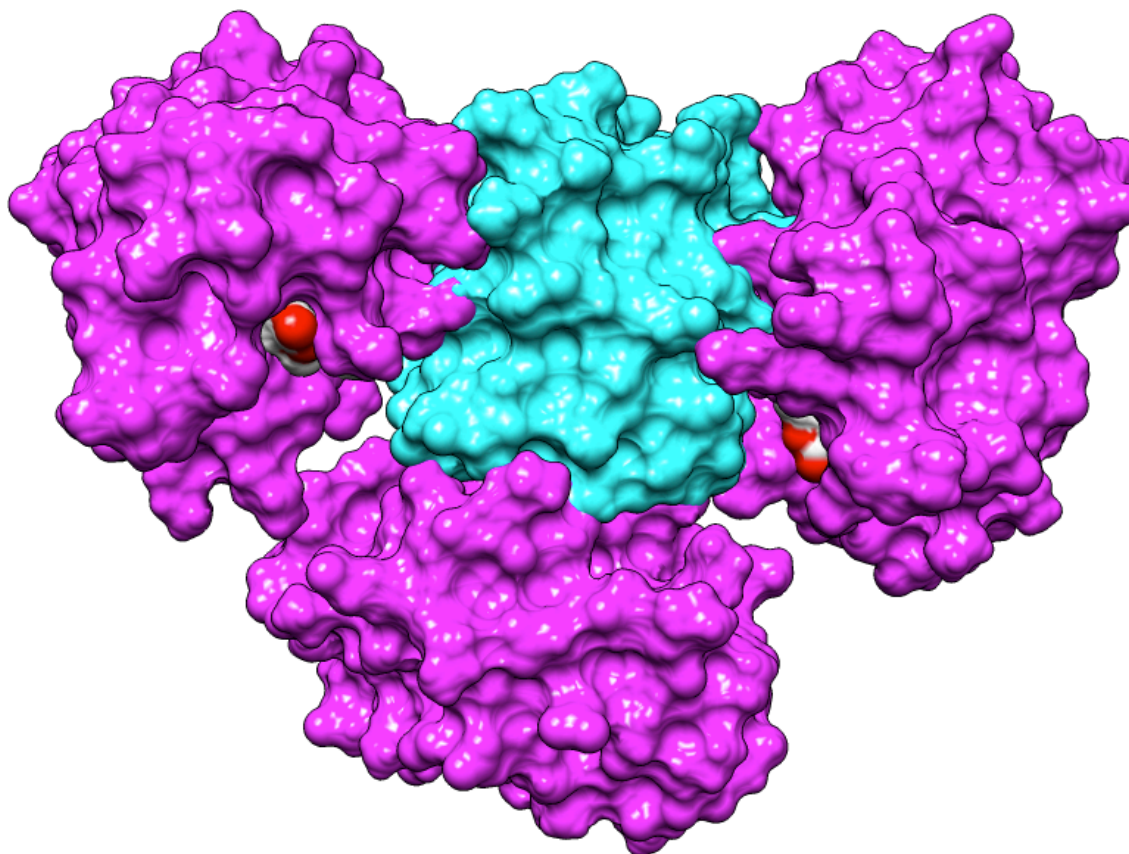
En el caso del complejo formado por el Cc y la PVALB determinado *in silico* mediante técnicas de DOCKING, encontramos tres resultados con una puntuación global muy parecida, lo que indica que el Cc podría estar explorando tres zonas de la superficie de la PVALB con igual frecuencia, lo que se muestra a continuación en la Figura 55. Igualmente, se aprecia cómo en todos los casos el grupo hemo del Cc presenta una orientación similar con respecto a la PVALB. Finalmente, el modelo del complejo Cc-PVALB nos muestra como dos de las tres moléculas de Cc presentan su grupo hemo orientado hacia los dos sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la PVALB.





**Figura 55.** Complejo formado por el Cc y la PVALB, determinado mediante técnicas de **DOCKING**. El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en color gris y la PVALB se representa en celeste. Los átomos de calcio aparecen representados en amarillo.

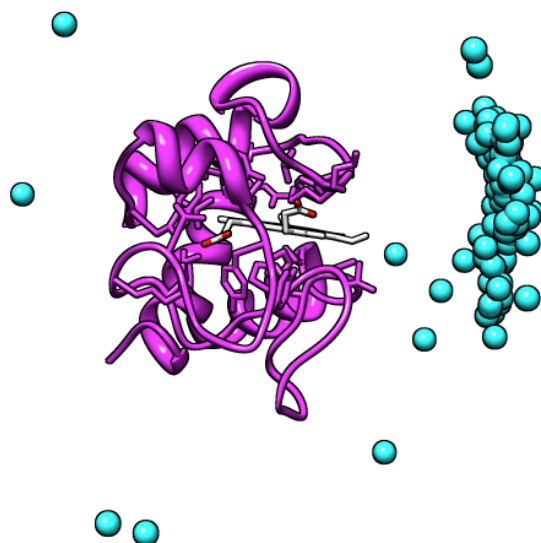
La representación de la superficie de cada uno de los componentes del complejo Cc-PVALB nos permite ver que la interacción tiene un alto componente geométrico, como se demuestra por la enorme proximidad y el encaje perfecto de todos los componentes en el complejo (Figura 56). Además, las superficies de interacción implican áreas muy cercanas a los centros metálicos (grupos hemo o átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de los tres componentes del complejo (Figura 55).



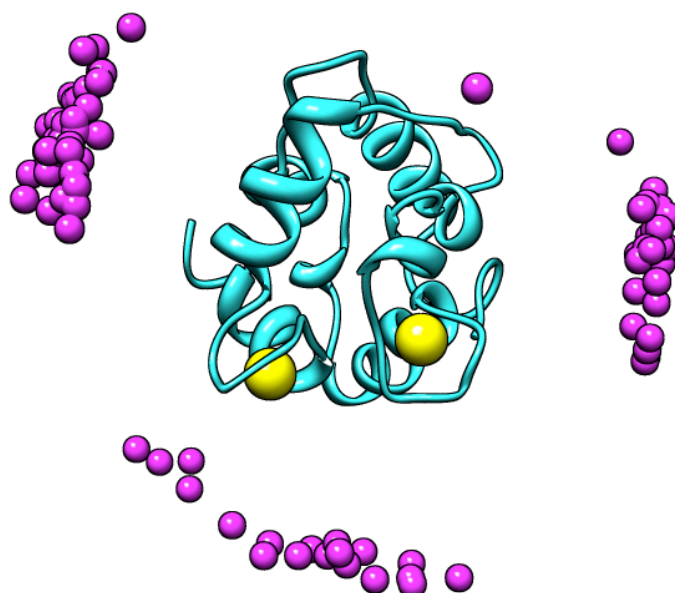
**Figura 56. Complejo formado por el Cc y la PVALB, determinado mediante técnicas de DOCKING, mostrando la superficie de cada uno de los componentes.** El Cc se representa en magenta, mientras que la PVALB se representa en celeste.

Por otro lado, las Figuras 57 y 58 nos muestran la distribución de los centros de masa de la PVALB respecto al Cc (Figura 57) y viceversa (Figura 58). La PVALB en el modelo de DOCKING en su interacción con el Cc, al igual que en los casos anteriormente expuestos, explora principalmente la superficie que se encuentra en torno al grupo hemo, siendo esta la zona que los citocromos de tipo c emplean para interaccionar con todas las dianas fisiológicas que se han descrito, concretamente citocromo  $c_1$  (König *et al.*, 1980), peroxidasa de citocromo c (Worrall *et al.*, 2001) o citocromo  $b_5$  (Volkov *et al.*, 2005). Por otro lado, en el modelo del complejo Cc-PVALB obtenido mediante DOCKING, se

aprecia que el Cc en su interacción con la PVALB explora dos sitios de unión, los cuales contienen los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de la PVALB.



**Figura 57. Representación de los centros de masa de la PVALB en el complejo Cc-PVALB.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global. El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la PVALB en celeste.

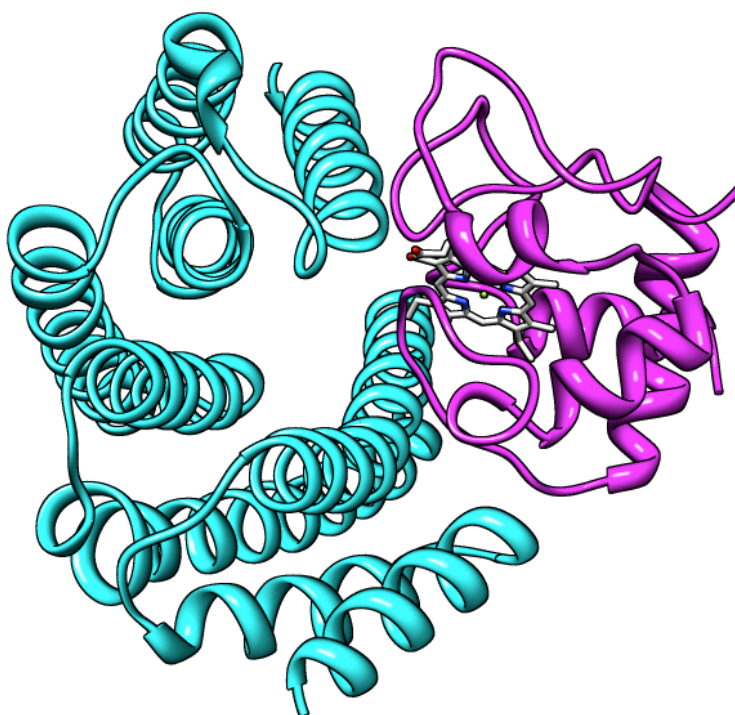


**Figura 58. Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-PVALB.** Se muestran los 100 modelos con mejor puntuación global. El Cc se representa en magenta, la PVALB en celeste y los átomos de calcio en amarillo.



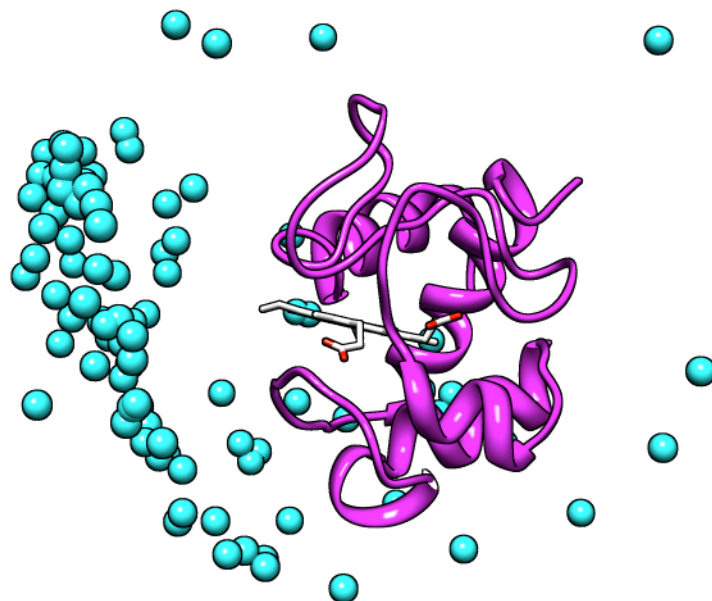
### 3.2.4.5. Complejo Citocromo c - YWHAE

Como se muestra en la figura 59, también se analizó el complejo formado entre el Cc y la YWHAE mediante técnicas de DOCKING. En este caso, al igual que en los complejos anteriormente estudiados - ALDOA-Cc, ANP32B-Cc y PVALB-Cc - la zona de interacción del Cc vuelve a ser la zona que se localiza en torno al grupo hemo.



**Figura 59. Complejo formado por el Cc y la YWHAE, determinado mediante técnicas de DOCKING.** El Cc se representa en magenta, el grupo hemo en gris y la YWHAE se representa en celeste.

También se llevó a cabo el análisis de la distribución de centros de masa del Cc respecto a la YWHAE, usando para ello los 100 modelos con mejor puntuación global obtenidos mediante técnicas de DOCKING, obteniendo los resultados mostrados en la figura 60.

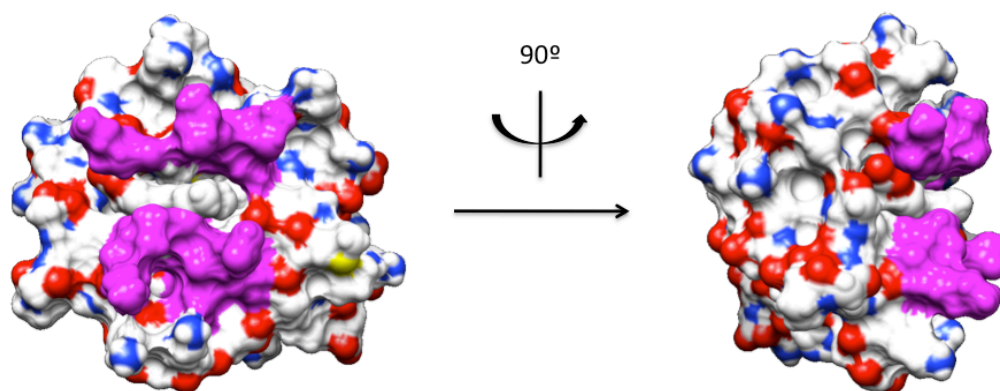


**Figura 60. Representación de los centros de masa del Cc en el complejo Cc-YWHA E.** Se muestran los 100 modelos obtenidos mediante DOCKING con mejor puntuación global. El Cc aparece en magenta, el grupo hemo en gris y la YWHA E en celeste.

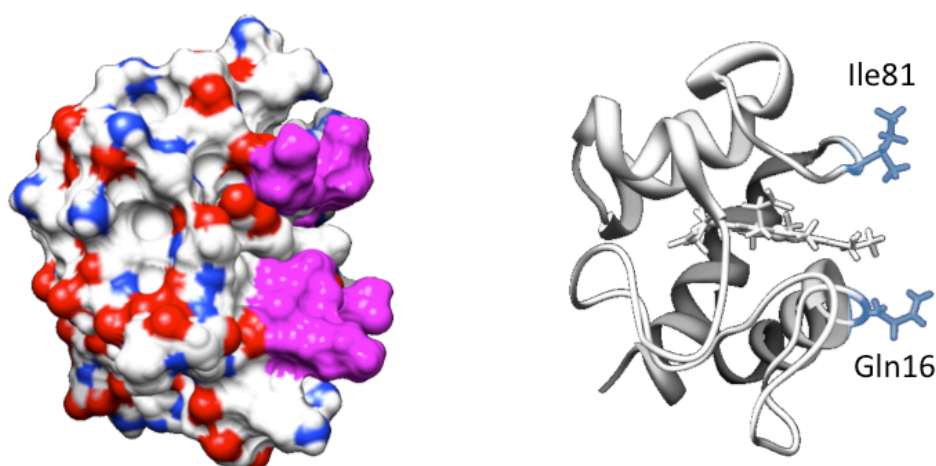
### 3.2.5. Efecto de las Mutaciones en la Zona de Interacción del Citocromo c

A partir de los datos de DOCKING pudimos delinear la zona de la superficie del Cc implicada en la interacción con las diferentes dianas analizadas, siendo en todos los casos aquella localizada en torno al grupo hemo. En la figura 61 se muestra la superficie del Cc, resaltando en magenta la zona propuesta como implicada en la interacción con estas dianas.

Con el objetivo de analizar si la zona implicada en la interacción, tal y como se determinó *in silico* mediante técnicas de DOCKING, era correcta, se diseñaron mutantes puntuales (ver apartado 2.12, Materiales y Métodos) en el Cc que afectaron a dos residuos, Ile81 y Gln16, los cuales se resaltan en la Figura 62.



**Figura 61.** Representación de la superficie del Cc indicando la zona de interacción determinada a partir de los datos de DOCKING. En magenta se muestran los residuos presentes en la zona de interacción determinada a partir de los complejos obtenidos mediante DOCKING.

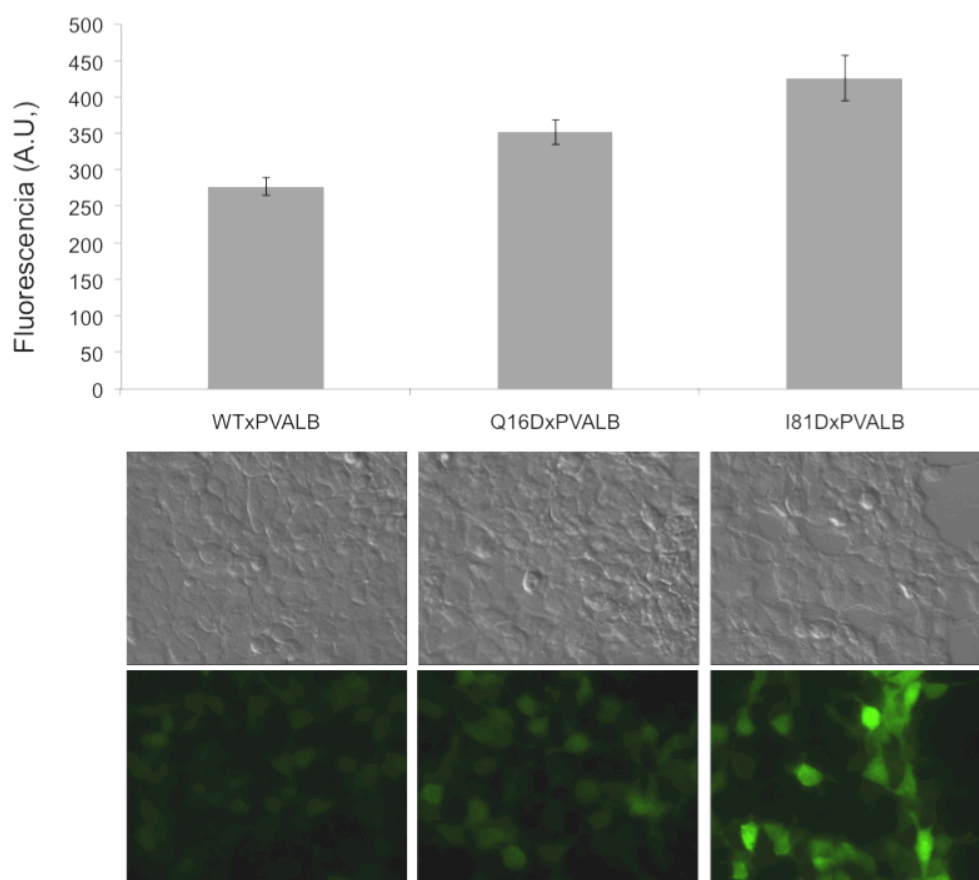


**Figura 62.** Representación de la superficie del Cc (izquierda) y de la estructura del Cc (derecha). En celeste (derecha) se muestran los residuos mutados, Ile81 y Gln16.

Ambos residuos se reemplazaron por aspártico, un aminoácido más pequeño y de carga negativa, con lo que pretendíamos estudiar tanto la importancia de la cadena lateral como de la carga. El efecto de las distintas mutaciones se analizó mediante BiFC, determinando la fluorescencia, consecuencia de la reconstrucción de la YFP en cada uno de los complejos analizados.

### 3.2.5.1. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - PVALB

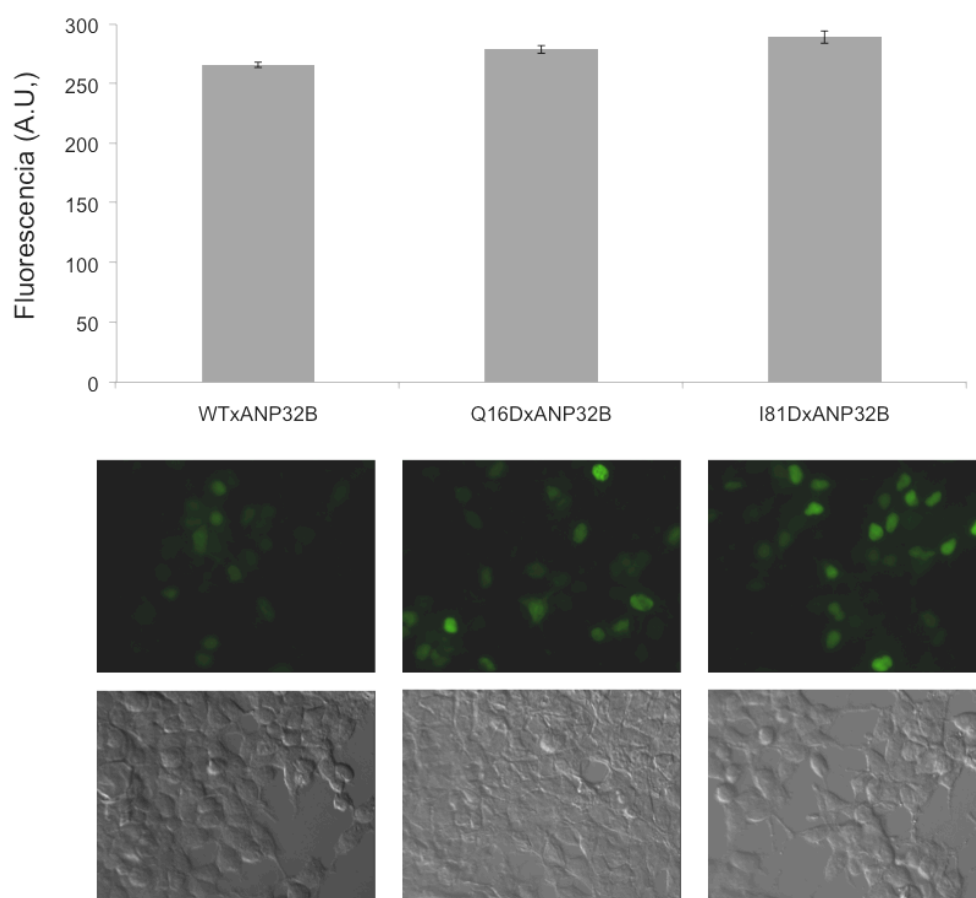
En la figura 63 se muestran los efectos de los distintos mutantes en el complejo Cc-PVALB, observándose en ambos casos como el reemplazamiento por aspártico favorece la interacción, siendo el efecto de la sustitución I81D más favorable que el de la sustitución Q16D.



**Figura 63. Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la PVALB.** Las células HEK293T fueron transfectadas con las construcciones indicadas, se trataron con CPT 10  $\mu$ M y 6 h después se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes aleatorias y se determinó la señal de la YFP como unidades arbitrarias (A.U.) de fluorescencia en cada una de ellas. Los datos que se muestran en la gráfica son la media de al menos 10 imágenes independientes (Arriba). Abajo se muestran ejemplos de las imágenes tomadas para cada una de las condiciones ensayadas.

### 3.2.5.2. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - ANP32B

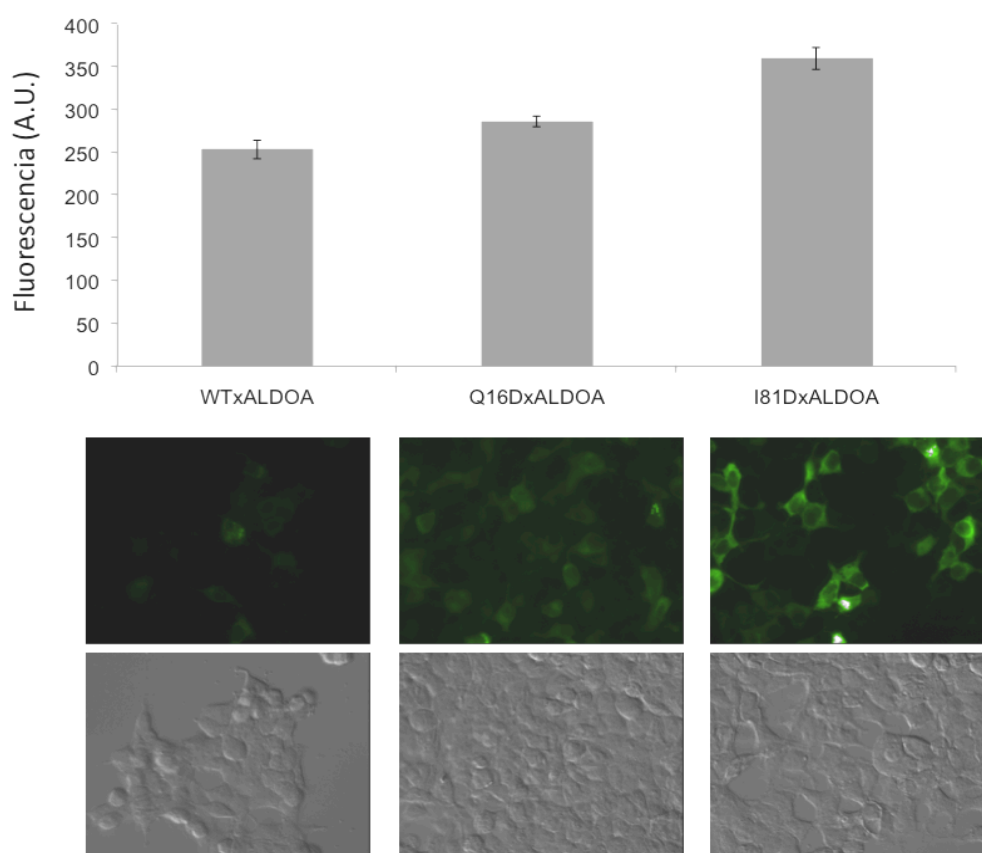
En la figura 64 se muestran los efectos de los distintos mutantes en el complejo Cc-ANP32B. En este caso se aprecia como ambas sustituciones, I81D y Q16D, no tienen efectos apreciables en la interacción del Cc y la ANP32B, mostrando la misma señal que se aprecia en el caso del Cc WT.



**Figura 64. Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la ANP32B.** Las células se transfectaron con las construcciones indicadas, se trataron con CPT 10  $\mu$ M y 6 h después se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes aleatorias y se determinó la señal de la YFP como unidades arbitrarias (A.U.) de fluorescencia en cada una de ellas. Los datos que se muestran en la gráfica son la media de al menos 10 imágenes independientes (Arriba). Abajo se muestran ejemplos de las imágenes tomadas para cada una de las condiciones ensayadas.

### 3.2.5.3. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - ALDOA

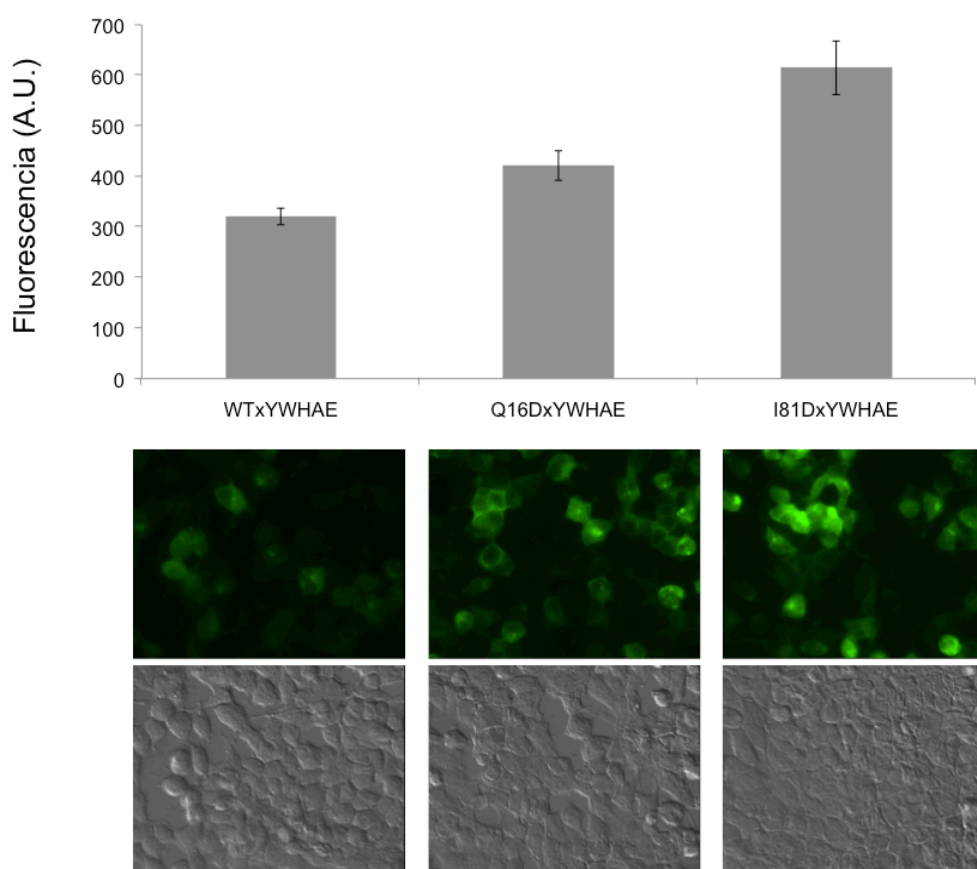
A continuación, se muestra el efecto de las mutaciones I81D y Q16D en la formación del complejo Cc-ALDOA (Figura 65). Se aprecia como la sustitución I81D tiene un efecto favorable, probablemente mediante la estabilización del complejo, mientras que la sustitución Q16D prácticamente carece de efecto sobre la formación del complejo.



**Figura 65. Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la ALDOA.** Las células se transfectaron con las construcciones indicadas, se trataron con CPT 10  $\mu$ M y 6 h después se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes aleatorias y se determinó la señal de la YFP como unidades arbitrarias (A.U.) de fluorescencia en cada una de ellas. Los datos que se muestran en la gráfica son la media de al menos 10 imágenes independientes (Arriba). Abajo se muestran ejemplos de las imágenes tomadas para cada una de las condiciones ensayadas.

### 3.2.5.4. Efecto de las Mutaciones en el Complejo Citocromo c - YWHAE

Finalmente, se muestra el efecto de ambas mutaciones sobre la formación del complejo Cc-YWHAE (Figura 66). Como se puede apreciar en la figura, mientras que la sustitución Q16D tiene un efecto pequeño sobre la interacción Cc-YWHAE, la sustitución I81D ejerce un fuerte efecto favorable sobre la formación del complejo.



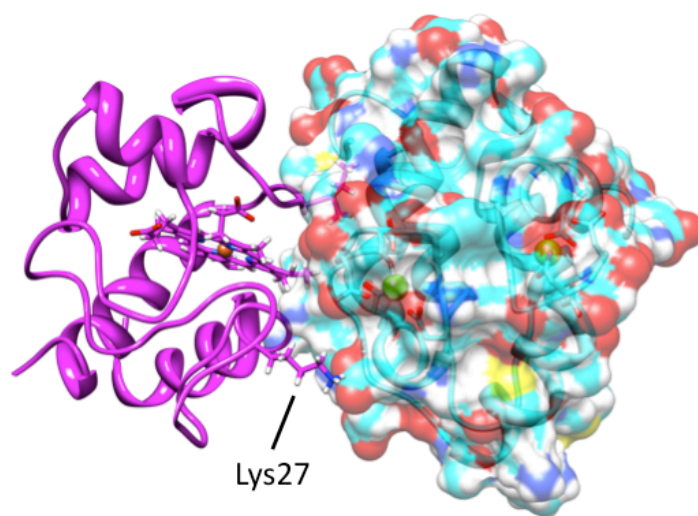
**Figura 66. Efecto de los diferentes mutantes de Cc en su interacción con la YWHAE.** Las células se transfectaron con las construcciones indicadas, se trataron con CPT 10  $\mu$ M y 6 h después se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes aleatorias y se determinó la señal de la YFP como unidades arbitrarias (A.U.) de fluorescencia en cada una de ellas. Los datos que se muestran en la gráfica son la media de al menos 10 imágenes independientes (Arriba). Abajo se muestran ejemplos de las imágenes tomadas para cada una de las condiciones ensayadas.



### 3.2.6. Inhibición del Efecto Anti-apoptótico de PVALB o NPM

Con el objetivo de estudiar el efecto del Cc en la función de algunas de sus dianas se tomaron como modelo las proteínas PVALB y NPM, las cuales han sido previamente descritas como proteínas anti-apoptóticas (Dekkers *et al.*, 2004; Dhar y St. Clair, 2009).

En el caso de la PVALB, se pretendía además estudiar el efecto de los distintos mutantes del Cc diseñados a partir de los modelos obtenidos mediante DOCKING (I81D e I81K) sobre el efecto anti-apoptótico de la PVALB (ver apartado 2.12, Materiales y Métodos). Aparte, se estudió el efecto de la mutación de la Lys27 del Cc sobre la interacción Cc-PVALB, ya que en el modelo obtenido por DOCKING para el complejo Cc-PVALB, este residuo se encuentra cerca de uno de los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 67).



**Figura 67. Complejo Cc-PVALB determinado mediante DOCKING mostrando la Lys27.** El Cc se muestra en magenta y la PVALB se muestra como superficie. Los átomos de calcio se muestran en verde. Se indica el residuo Lys27 del Cc, el cual ha sido mutado por por Glu o Ala.

Concretamente, se ha descrito que la sobreexpresión de PVALB o de NPM producen una inhibición de la apoptosis inducida por un aumento en la



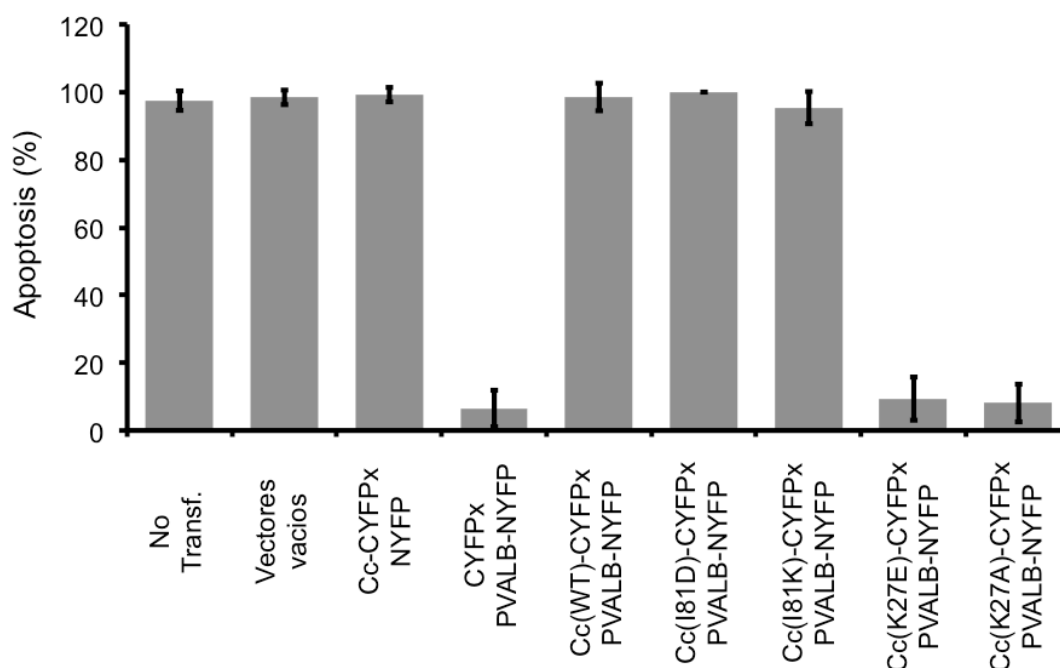
concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Dekkers *et al.*, 2004) o por daños en el ADN (Dhar y St. Clair, 2009), respectivamente.

Con el objetivo de comprobar si la interacción del Cc con estas dianas tiene importancia a nivel fisiológico, hemos sobreexpresado las construcciones PVALB-NYFP o NPM-NYFP conjuntamente con el fragmento CYFP con o sin el Cc fusionado. En los casos en los que se sobreexpresa la PVALB, la apoptosis se indujo mediante TG 2  $\mu\text{M}$ , la cual aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Favero y Abramson, 1994). Por otro lado, cuando se sobreexpresó NPM la apoptosis se indujo mediante CPT 10  $\mu\text{M}$ , el cual causa daños en el DNA (Johnson *et al.*, 1997) (ver apartado 2.13, Materiales y Métodos). Como se muestra en las Figuras 68 y 69, la sobreexpresión tanto de PVALB como de NPM es suficiente para rescatar de la apoptosis a aquellas células en las que estas proteínas se están expresando, lo que se visualiza mediante la fluorescencia de la YFP, consecuencia de la reconstitución de ésta. La determinación del porcentaje de apoptosis se realizó mediante la tinción por DAPI, determinando el número de células apoptóticas positivas para DAPI en células positivas para la señal de la YFP (ver apartado 2.13, Materiales y Métodos). Sin embargo, la sobreexpresión del Cc en conjunto con la PVALB o NPM parece eliminar los efectos anti-apoptóticos de estas dianas en aquellas células en las que la reconstitución de la YFP, consecuencia de la formación de los complejos Cc-PVALB o Cc-NPM, ha tenido lugar (Figuras 68 y 69). Por lo tanto, el Cc parece interaccionar y, en consecuencia, secuestrar a las proteínas anti-apoptóticas PVALB o NPM, permitiendo de este modo que las células entren en apoptosis.

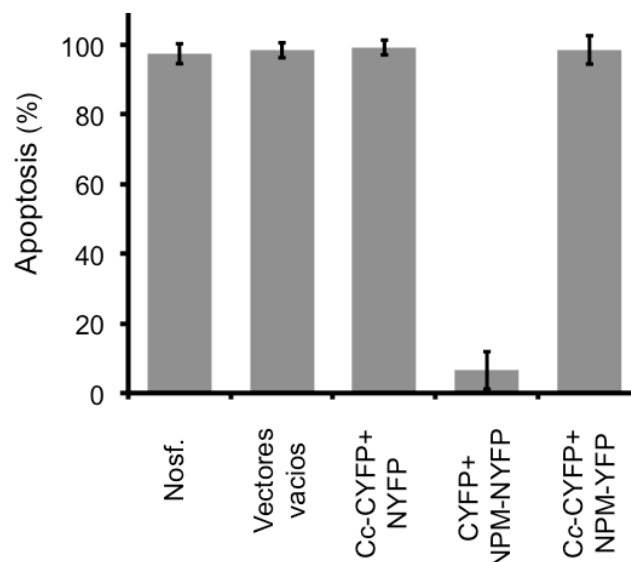
Es interesante tener en cuenta el hecho de que no se aprecien diferencias sustanciales en el porcentaje de células apoptóticas entre las células no transfectadas o transfectadas con los vectores vacíos y aquellas que sobreexpresan el Cc 24 h después de inducir apoptosis. Esto puede explicarse en base a que el Cc presente en el espacio intermembrana de la mitocondria de células no transfectadas es suficiente para la activación de la apoptosis, por lo que la sobreexpresión de Cc tiene un efecto menor.

En el caso de la PVALB, para la cual se contaba con un modelo del complejo determinado *in silico* mediante técnicas de DOCKING (ver apartado 3.2.4.4, en Resultados), se analizó el efecto de los distintos mutantes de Cc (I81D, I81K, K27E y K27A) sobre el efecto anti-apoptótico de la PVALB en el complejo Cc-PVALB. Como se aprecia en la figura 68, la sobre-expresión de PVALB y los mutantes I81D o I81K del Cc bloquea el efecto antiapoptótico de PVALB, permitiendo alcanzar niveles de apoptosis similares a las células HEK293T no transfectadas, transfectadas con los vectores vacíos o transfectadas con PVALB y Cc WT. Estos resultados indican que las mutaciones I81D e I81K no tienen efecto a nivel funcional y, como se muestra en la Figura 70, permiten la interacción Cc-PVALB. Igualmente, el uso de estos dos mutantes de Cc, en los que la Ile81 se reemplazó por aspártico o lisina, nos permitió observar que en ambos casos la interacción es más intensa que con el Cc WT (Figura 70). Esto nos permitió determinar que en realidad estas mutaciones favorecen la interacción Cc-PVALB, quizás como consecuencia de la reducción en el volumen de la cadena lateral, disminuyendo el efecto estérico de la cadena lateral de la isoleucina.

Por otra parte, también se analizó el efecto de los mutantes K27E y K27A. Ambos mutantes, como se muestra en la Figura 70 son capaces de interaccionar con la PVALB, lo que se deduce de la capacidad de reconstituir la fluorescencia de la YFP. Sin embargo, como se muestra en la Figura 68 ambos mutantes, a pesar de interaccionar con la PVALB, no son capaces de abolir el efecto anti-apoptótico de la PVALB, no observándose un aumento en los niveles apoptóticos 24 horas después de haber tratado a las células con TG 2 $\mu$ M.

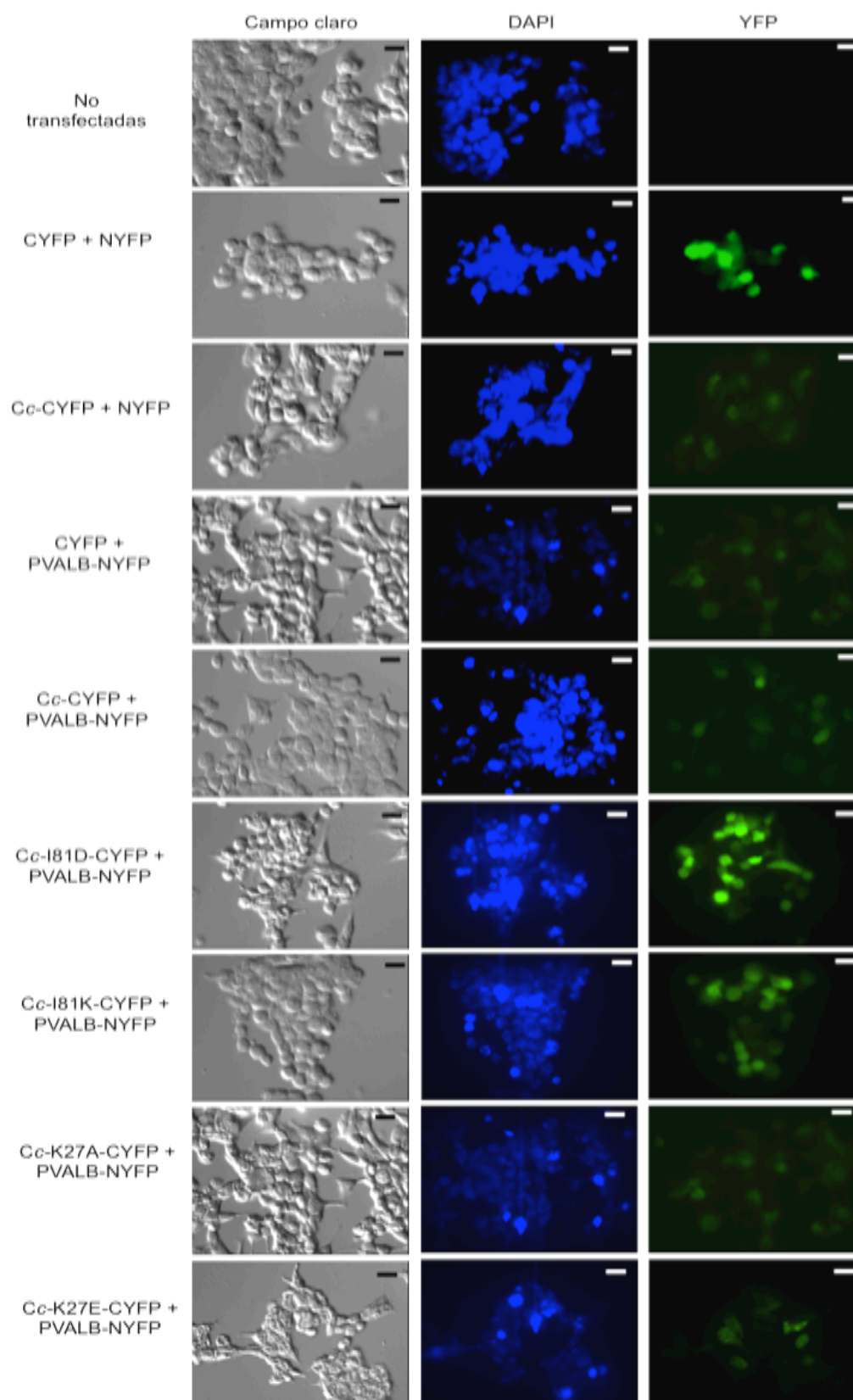


**Figura 68.** Inducción de apoptosis en HEK293T con TG 2  $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de PVALB o de PVALB con Cc (WT y diferentes mutantes). Las células HEK293T transfectadas con las construcciones indicadas en la figura se trataron con TG 2  $\mu$ M y tras 6 h se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. El porcentaje de apoptosis se determinó como el cociente entre el número de células con núcleo apoptótico visualizado con DAPI en células positivas para YFP y el número total de células positivas para YFP en al menos 10 imágenes para cada construcción. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

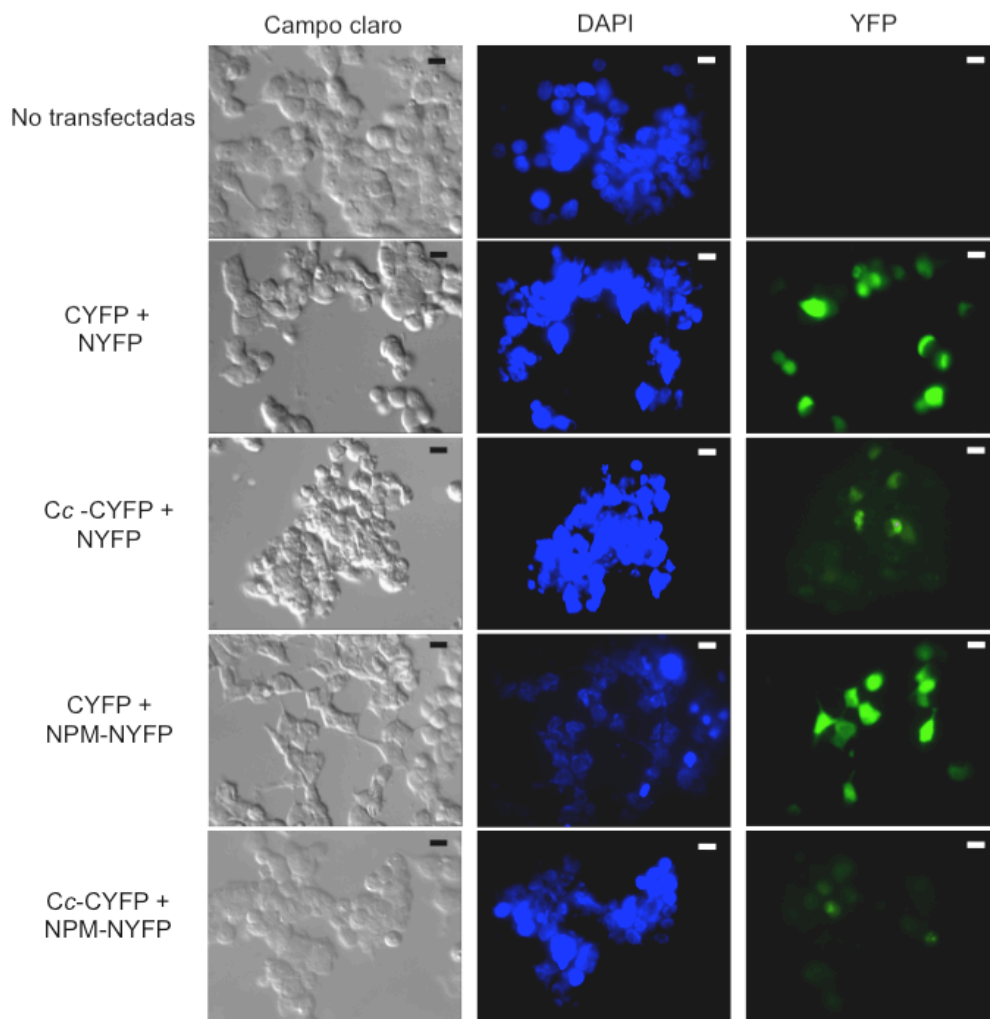


**Figura 69. Inducción de apoptosis en HEK293T con CPT 10  $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de NPM o de NPM con Cc WT.** Las células HEK293T transfectadas con las construcciones indicadas en la figura se trataron con CPT 10  $\mu$ M y tras 6 h se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. El porcentaje de apoptosis se determinó como el cociente entre el número de células con núcleo apoptótico visualizado con DAPI en células positivas para YFP y el número total de células positivas para YFP en al menos 10 imágenes aleatorias para cada construcción. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

Al mismo tiempo, el aspecto apoptótico de los núcleos de células tratadas con TG 2  $\mu$ M o CPT 10  $\mu$ M visualizados mediante DAPI se correlacionan con cambios en la morfología de estas mismas células, característicos de un proceso apoptótico (Figuras 70 y 71). La pérdida de adherencia en las células co-expresando Cc con PVALB o NPM se correlaciona con una señal positiva para el DAPI, lo que sugiere que los complejos Cc-PVALB o Cc-NPM – corroborados mediante el ensamblaje de la YFP – activan la respuesta apoptótica. En cambio, las células en las que se sobreexpresó PVALB o NPM con el fragmento CYFP sin Cc presentan una forma alargada, mayor adherencia y una baja señal de DAPI, características de células creciendo en condiciones homeostáticas.



**Figura 70. Imágenes de la Inducción de apoptosis en HEK293T con TG 2  $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de PVALB o de PVALB con Cc (WT y diferentes mutantes). La escala representa 15  $\mu$ m.**



**Figura 71.** Inducción de apoptosis en HEK293T con CPT 10  $\mu$ M y efecto de la sobreexpresión de NPM o de NPM con Cc WT. La escala representa 15  $\mu$ m.

### 3.3. Papel del Citocromo c en la PCD de Plantas

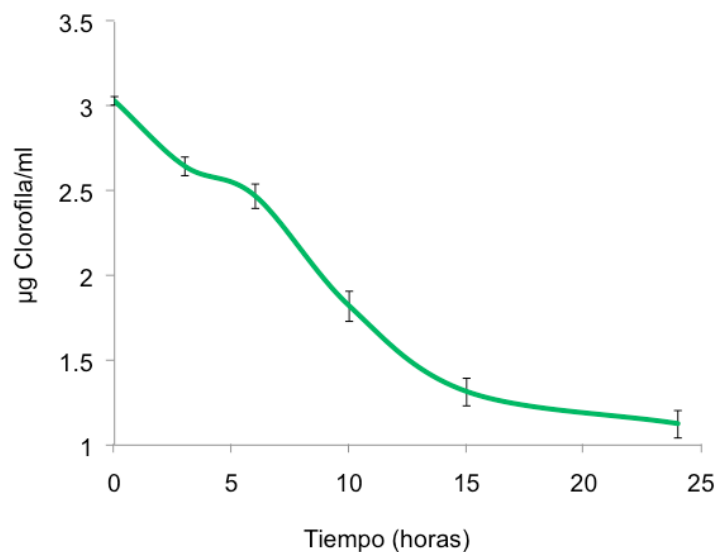
#### 3.3.1. Inducción de PCD en Células de *Arabidopsis thaliana* y Preparación de Extractos Totales

Como se indicó anteriormente, la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol es un evento conservado a lo largo de la evolución, y la implicación de la mitocondria en la PCD en plantas ha sido propuesta en múltiples trabajos (Balk *et al.*, 1999; Balk y Leaver, 2001) (ver apartado 1.7.3, Introducción).

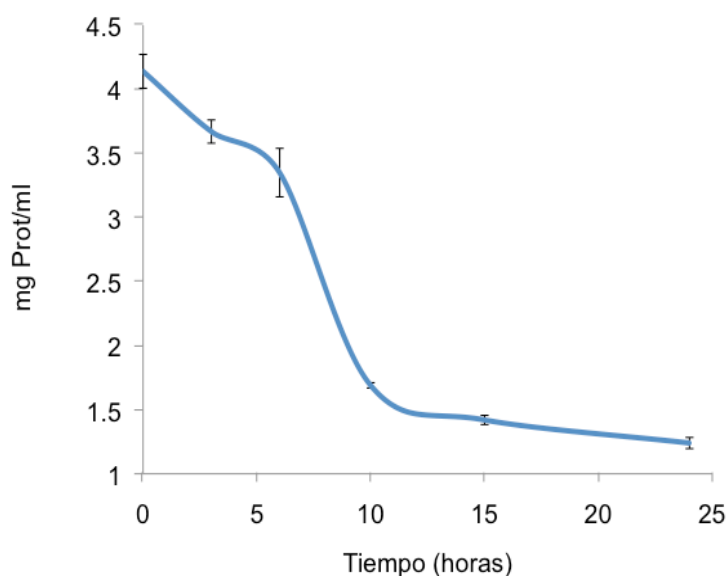
Por lo tanto, con el objetivo de identificar nuevas dianas del Cc de *A. thaliana* durante la PCD, que nos puedan servir como punto de partida para intentar determinar el, por ahora, esquivo papel del Cc durante la PCD vegetal, se prepararon extractos totales tanto de células creciendo en condiciones homeostáticas como de células en las que se indujo PCD mediante  $H_2O_2$ , siguiendo posteriormente una aproximación similar a la usada en el caso de las células humanas. Para ello se emplearon células MM2d de *A. thaliana* cultivadas en medio MS (ver apartado 2.1.2, Materiales y Métodos). La PCD fue inducida con  $H_2O_2$  35 mM (Desikan *et al.*, 1998), y las células fueron recogidas para la preparación de los extractos 6 horas después de inducir PCD, momento en el que el Cc ha sido liberado desde la mitocondria en el citosol, tal y como se ha descrito previamente (García-Heredia *et al.*, 2008). Para comprobar que las células tratadas con  $H_2O_2$  mueren por PCD se analizaron algunos de los marcadores que caracterizan al proceso de PCD en plantas, entre los que destacan la degradación de la clorofila, una dismunición en el contenido proteico debido a la activación de proteasas y una disminución paulatina en la viabilidad celular (Hörtensteiner, 2006).

Tras 6 horas de la adición de  $H_2O_2$  35 mM a células MM2d, se puede observar una reducción en los contenidos tanto de clorofila (Figura 72) como de proteína (Figura 73), mientras que la viabilidad celular se mantiene en torno a un 75 % (Figura 74). En cambio, 24 horas después de inducir PCD se aprecia como los contenidos tanto de proteína como de clorofila han disminuido drásticamente (Figuras 72 y 73), lo que indica la activación de eventos proteolíticos. De forma concordante se observa como transcurridas 24 horas tras la inducción de PCD

la viabilidad celular se ha reducido a un 20 %, mientras que en un cultivo no tratado se mantiene en torno al 100 %.

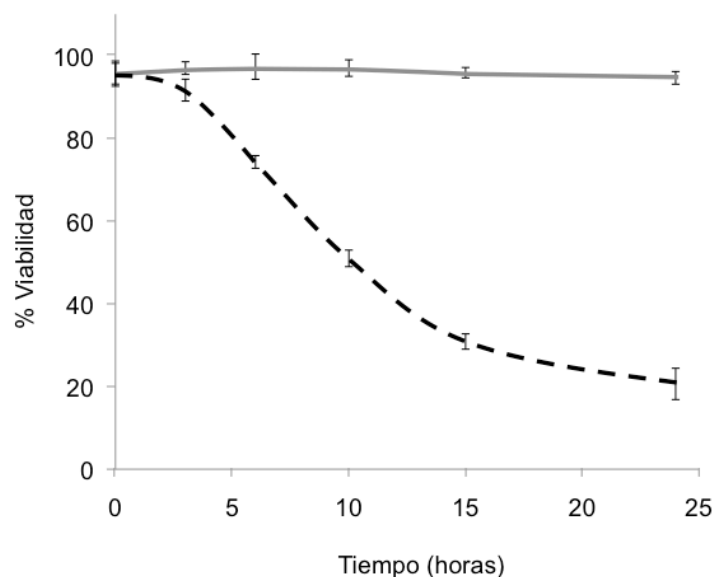


**Figura 72. Variación del contenido en clorofila en cultivos de *A. thaliana* tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM.** A los tiempos indicados se extrayeron alícuotas del cultivo, determinando la concentración de clorofila ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (ver apartado 2.5.4, Materiales y Métodos). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.



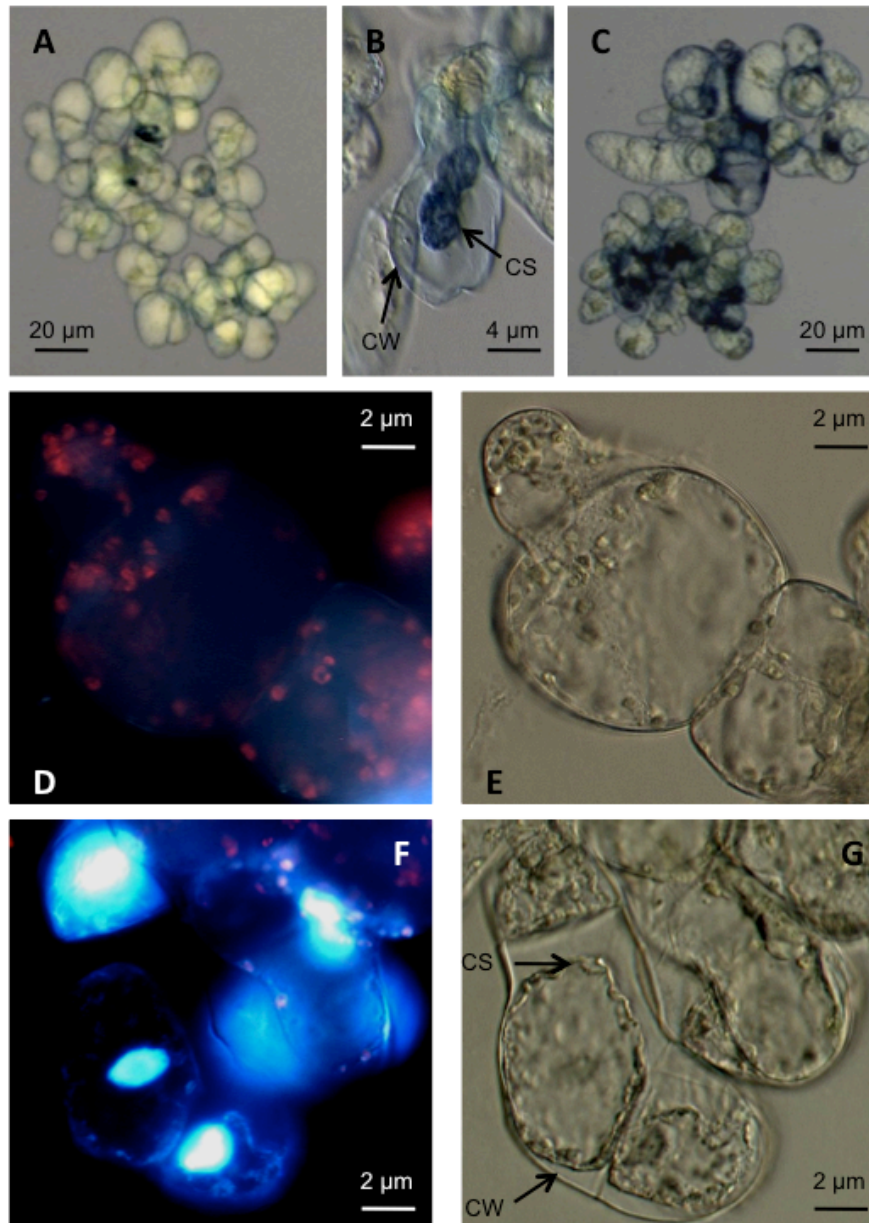
**Figura 73. Variación del contenido en proteína en cultivos de *A. thaliana* tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM.** A los tiempos indicados se extrayeron alícuotas del cultivo, determinando la concentración de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), tal y como se explicó en Materiales y Métodos (Apartado 2.5.4). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.





**Figura 74. Viabilidad celular en cultivos de *A. thaliana* tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM (línea discontinua) o no tratados (línea continua) determinada mediante el método de exclusión de azul Trypan.** A los tiempos indicados se extrayeron alícuotas de ambos cultivos. Los datos representan la media de tres experimentos independientes (ver apartado 2.5.2, Materiales y Métodos). En cada experimento se contaron al menos 300 células.

Al mismo tiempo, se analizaron algunos marcadores morfológicos característicos de la PCD vegetal, como la condensación citoplásmica, la disminución de la clorofila o la condensación de la cromatina (Houot *et al.*, 2001). Las Figuras 75.B y 75.C muestran células MM2d muertas teñidas con azul Trypan 24 horas después de inducir PCD con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación con células no tratadas (Figura 75.A). De modo similar, en células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras 24 horas se hace apreciable la condensación citoplásmica (Figura 75.G) cuando se comparan con células no tratadas (Figura 75.E). Igualmente, se aprecia una importante señal de condensación nuclear en células tratadas cuando se tiñen con DAPI, así como una reducción en la fluorescencia debida a la clorofila (en rojo) (Figura 75.F) al compararlas con células control (Figura 75.D), lo que se correlaciona con una reducción en el contenido en clorofila (Figura 72).



**Figura 75. Marcadores de PCD vegetal en cultivos de *A. thaliana*.** Seguimiento de marcadores de PCD vegetal, como condensación citoplásmica y nuclear o degradación de la clorofila en cultivos de *A. thaliana* tratados con 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B, C, F y G) o no tratadas (A, D y E). Células de *A. thaliana*, no tratadas (A) o tratadas (B y C) fueron teñidas con azul Trypan para determinar el porcentaje de viabilidad. Igualmente, se muestran en campo visible células no tratadas (E) o tratadas (G) donde se aprecia la condensación citoplásmica. Se muestra una imagen de estas mismas células en microscopía de fluorescencia, células tratadas (F) y células no tratadas (D), donde el núcleo aparece en azul gracias a la tinción con DAPI y la clorofila en rojo gracias a su auto-fluorescencia. CS: condensación citoplásmica; CW: pared celular.

En conjunto todos estos cambios bioquímicos y morfológicos señalan la ocurrencia de un proceso de PCD inducido por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

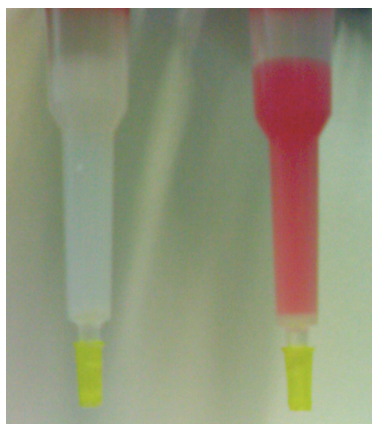
### **3.3.2. Identificación de Nuevas Dianas del Citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana***

#### **3.3.2.1. Cromatografía de Afinidad**

Para la identificación de nuevas dianas del Cc de *A. thaliana* (Cc) durante la PCD vegetal se empleó una aproximación proteómica basada en cromatografía de afinidad, de manera similar a la utilizada en el caso de *H. sapiens*. Igualmente se empleó la matriz TS-4B, la cual puede unir covalentemente proteínas a través de cisteínas libres. El Cc de *A. thaliana*, al igual que sucedía con el Cc de *H. sapiens*, sólo presenta dos residuos de cisteína en su cadena polipeptídica, los cuales están implicados en la unión covalente del grupo hemo por medio de dos enlaces tioéter (Allen *et al.*, 2002). Por lo tanto, fue necesario introducir un residuo de cisteína adicional mediante PCR mutagénica, a través del cual poder unir covalentemente el Cc de *A. thaliana* a la matriz TS-4B mediante un puente disulfuro. Esto se logró mediante el reemplazamiento de una alanina en el extremo carboxi-terminal, obteniendo así el mutante A111C (ver apartado 2.3.1, Materiales y Métodos).

Una vez purificada esta variante del Cc de *A. thaliana* mediante cromatografía de intercambio iónico (Rodríguez-Roldán *et al.*, 2006) (ver apartado 2.3.2, Materiales y Métodos), se unieron 30 mg de A111C a la matriz TS-4B según el protocolo descrito previamente en la literatura (Azzi *et al.*, 1982), para obtener de este modo la columna A111C TS-4B. De igual modo, se preparó una columna control, para lo que la matriz TS-4B se trató del mismo modo, salvo

que no se incubó con Cc (Figura 76) (ver apartado 2.7.1, Materiales y Métodos).



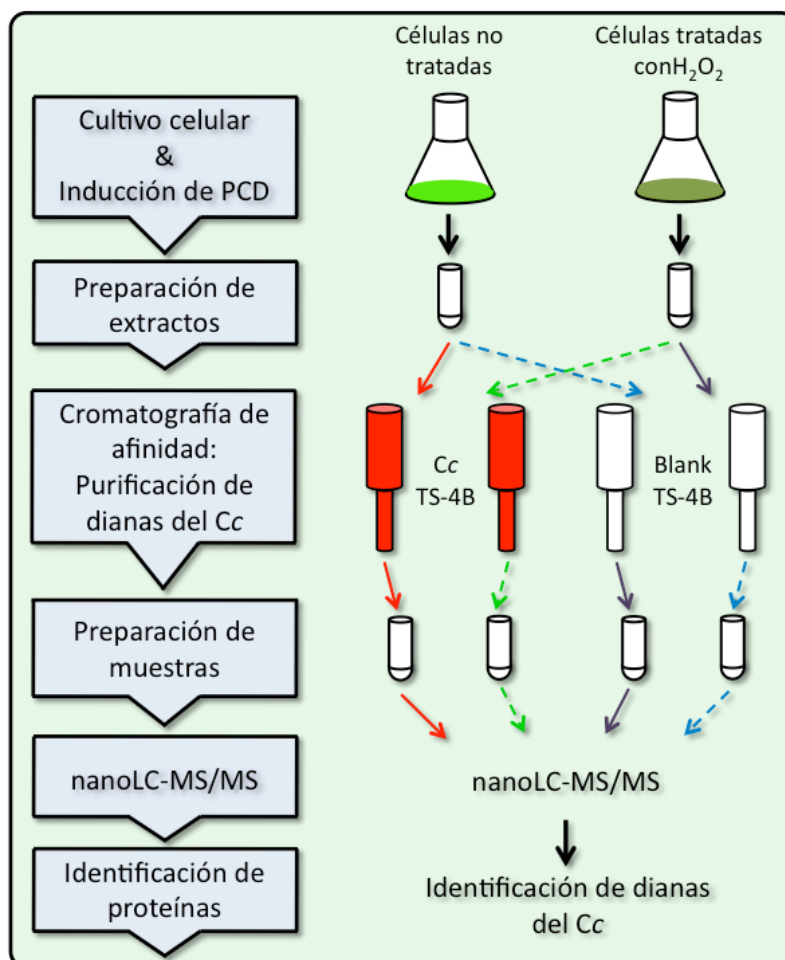
**Figura 76. Columnas de tiol-sefarosa 4B usadas para la cromatografía de afinidad.** Columna control (sin Cc) a la izquierda y con Cc A111C unido a la derecha.

#### 3.3.2.2. NanoLC-MS/MS

Los extractos totales obtenidos a partir de células MM2d tratadas o no tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM fueron pasados a través de columnas de TS-4B con Cc unido (A111C TS-4B) o sin Cc unido (columna control). Las posibles dianas del Cc fueron eluidas incrementando la fuerza iónica (ver apartado 2.7.2, Materiales y Métodos), preparadas y analizadas mediante nanoLC-MS/MS, (ver apartado 2.8.5, Materiales y Métodos).

De este modo se obtuvieron cuatro tipos de muestras diferentes dependiendo de las condiciones experimentales: i) proteínas procedentes de células no tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM purificadas usando una columna blanco, ii) proteínas procedentes de células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM purificadas usando una columna blanco, iii) proteínas procedentes de células no tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM purificadas usando una columna A111C TS-4B, y iv) proteínas procedentes de células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM purificadas usando una columna A111C

TS-4B. Las muestras fueron concentradas mediante liofilización de forma individual y analizadas mediante nanoLC-MS/MS (Figura 77).



**Figura 77. Identificación de nuevas dianas del Cc de *A. thaliana*.** Aproximación empleada para la identificación de nuevas dianas del Cc mediante cromatografía de afinidad y análisis posterior por medio de nanoLC-MS/MS.

Para ensayos posteriores se tuvieron en cuenta exclusivamente aquellas proteínas que se identificaron a partir de las muestras proteicas procedentes de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM purificadas usando una columna A111C TS-4B, las cuales se indican en la Tabla 11, es decir, aquellas proteínas que podrían ser dianas del Cc citosólico en condiciones de PCD. La localización celular mostrada en la tabla es la extraída de las bases de datos PUBMED ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) y TAIR ([www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)).

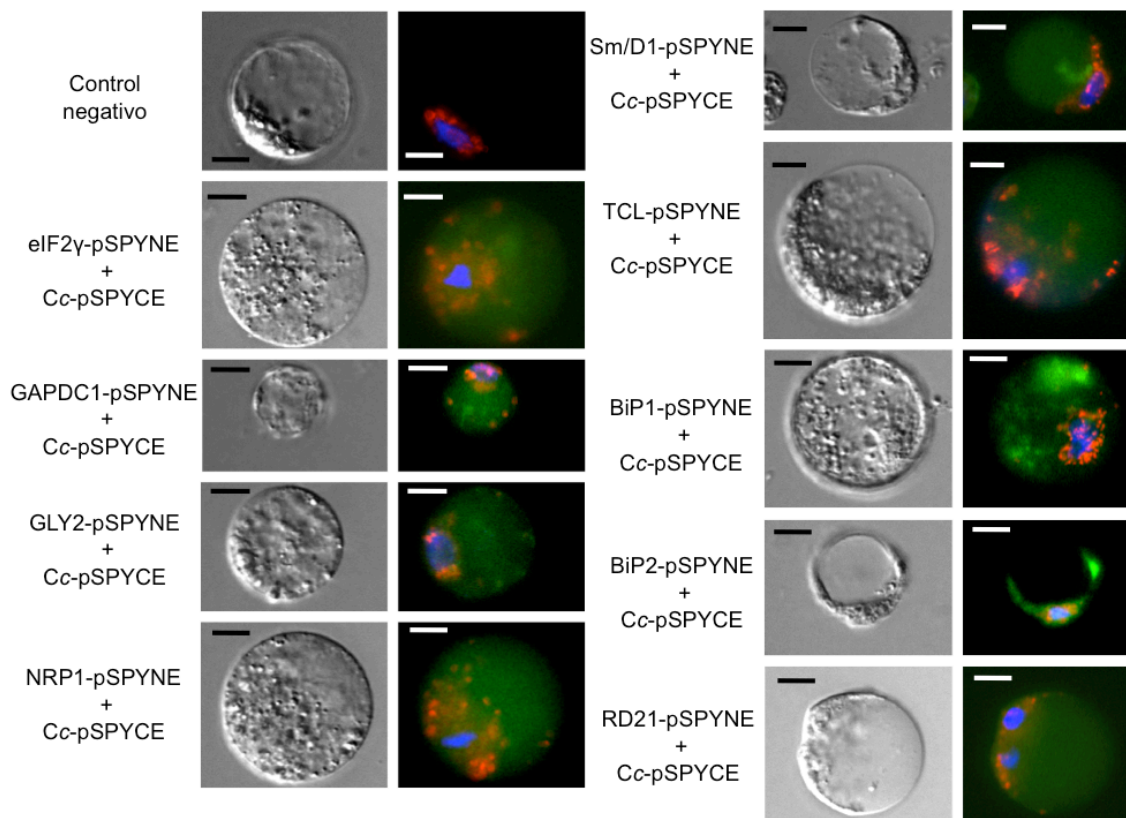
Tabla 11. Dianas del Cc de <i>A. thaliana</i> mediante cromatografía de afinidad y nanoLC-MS/MS.						
Nombre de la proteína	Gen	NCBI	Puntuación	Localización celular	MW (kDa)/pI	
Apoptosis inhibitory 5 (1)	<i>API5 (1)</i>	AT1G29030	45	No determinado	62,3/8,91	
Apoptosis inhibitory 5 (2)	<i>API5 (2)</i>	AT2G34040	45		61,6/8,05	
Translation initiation factor 2 gamma	<i>eIF2γ</i>	AT1G04170	45	Citoplasma	50,8/8,96	
Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase	<i>GAPDC1</i>	AT3G04120	100		36,9/6,62	
Glyoxalase 2	<i>GLY2</i>	AT3G10580	43		28,8/5,93	
Nucleosome assembly protein 1	<i>NRP1</i>	AT1G74560	62	Núcleo, Citoplasma	29,4/4,23	
Small nuclear ribonucleoprotein	<i>Sm/D1</i>	AT4G02840	96		12,75/11,23	
Transcriptional coactivator	<i>TCL</i>	AT5G59950	186		25,7/9,83	
Luminal protein BiP1	<i>BiP1</i>	AT5G28540	47	Retículo endoplásmico	73,6/5,08	
Luminal protein BiP2	<i>BiP2</i>	AT5G42020	47		73,6/5,11	
Cysteinproteinase RD21	<i>RD21</i>	AT1G47128	34	Cuerpos del RE	50,9/5,26	

### 3.3.3. Verificación de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas en Protoplastos Mediante BiFC

Los cDNAs codificantes tanto del Cc de *A. thaliana* como de las dianas del Cc de *A. thaliana* fueron adquiridos a ABRC (<http://www.arabidopsis.org/abrc>). De las 11 proteínas identificadas por proteómica (Tabla 11) sólo 9 pudieron ser amplificadas mediante PCR, no pudiendo ser obtenidas ni API5-1 ni API5-2. El cDNA del Cc de *A. thaliana* fue fusionado al extremo amino-terminal del fragmento C-YFP en el vector *pSPYCE*, mientras que las dianas del Cc de *A. thaliana* fueron fusionadas en el extremo amino-terminal del fragmento N-YFP en el vector *pSPYNE* (Walter *et al.*, 2004). En la tabla 6 (ver apartado 2.9.2, Materiales y Métodos) se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron para la amplificación mediante PCR de los distintos cDNAs, introduciendo los sitios de restricción apropiados para su posterior clonación en los vectores anteriormente mencionados (Figura 28, Materiales y Métodos).

La transformación de los protoplastos se realizó según el método descrito por Sheen (2002), y los resultados del BiFC se obtuvieron 24 horas después de inducir PCD con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM (Figura 78). Como se aprecia en la Figura 78, todas las dianas del Cc de *A. thaliana* obtenidas mediante cromatografía de afinidad, identificadas mediante nanoLC-MS/MS y ensayadas mediante BiFC interaccionan *in vivo* con el Cc bajo condiciones de PCD. Como se aprecia en todos los casos, la señal YFP se localiza en el citoplasma celular, lo que indica que la interacción entre el Cc de *A. thaliana* y estas dianas se produce a nivel citoplásmico. Como control negativo se emplearon protoplastos no transfectados, utilizando su auto-fluorescencia como límite a partir del cuál establecer las interacciones positivas.





**Figura 78. Análisis de la interacción entre el Cc de *A. thaliana* y sus nuevas dianas en protoplastos mediante BiFC.** Los protoplastos obtenidos y transfectados con las construcciones indicadas en cada caso (ver apartado 2.9.5, Materiales y Métodos) se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM como inductor de muerte celular, y 24 horas después se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. En cada caso a la izquierda se muestra la imagen en campo claro y a la derecha la imagen de microscopía de fluorescencia donde el núcleo aparece en azul gracias al DAPI, la clorofila en rojo y la señal debida a la reconstitución de la YFP en verde. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.4. Verificación de la Interacción del Citocromo c con sus Dianas en Células HEK293T Mediante BiFC

Con el objetivo de comprobar la capacidad de las dianas del Cc de *A. thaliana* de interactuar con éste en un sistema heterólogo independiente, y en el que la PCD está bien descrita, se ensayó esta interacción en células humanas HEK293T mediante BiFC en condiciones apoptóticas. Tanto el cDNA del Cc de

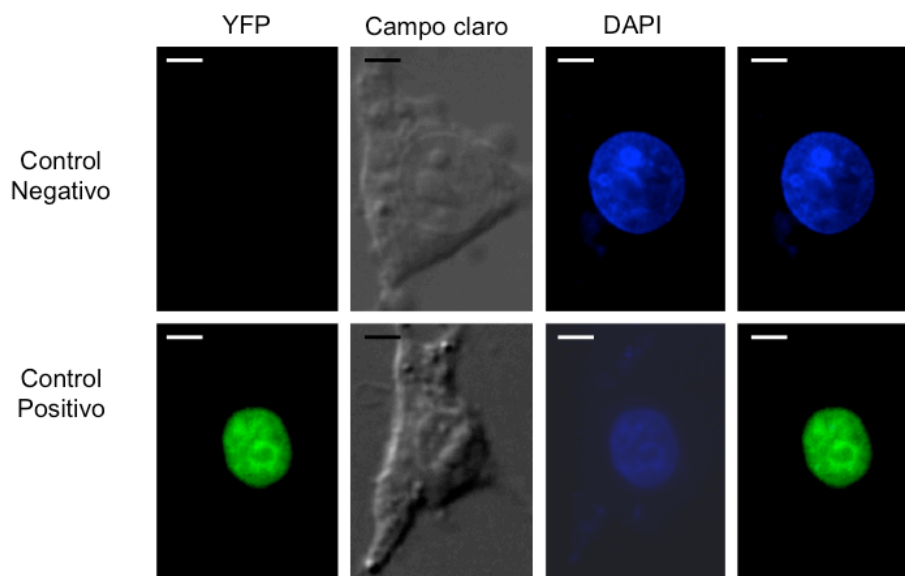


*A. thaliana* como los cDNAs de sus dianas fueron clonados en los vectores *pCYFP* y *pNYFP*, respectivamente (Gandia *et al.*, 2008). Con este objetivo, se diseñaron los oligonucleótidos apropiados para la amplificación de los cDNAs mediante PCR (ver apartado 2.9.3, Materiales y Métodos), introduciendo al mismo tiempo los sitios de restricción apropiados para su posterior clonación en los vectores anteriormente indicados (Figura 29, Materiales y Métodos).

Concretamente, el cDNA del Cc de *A. thaliana* fue fusionado al extremo amino-terminal del fragmento C-YFP en el vector *pCYFP*, mientras que las dianas del Cc de *A. thaliana* fueron fusionados al extremo amino-terminal del fragmento N-YFP en el vector *pNYFP*, usándose para la transfección de las células HEK293T.

Al igual que en el caso de las construcciones estudiadas en humanos, en este caso la expresión transitoria de las dianas del Cc fusionadas a la NYFP en los ensayos de BiFC fue comprobada por medio de Western blot, usando para ello un anticuerpo policlonal de conejo contra la EGFP (ver apartado 2.10, Materiales y Métodos). Como se muestra posteriormente en las figuras 80-83, todas las construcciones analizadas dieron una banda con la masa molecular esperada para las distintas construcciones, indicando que éstas se expresan correctamente.

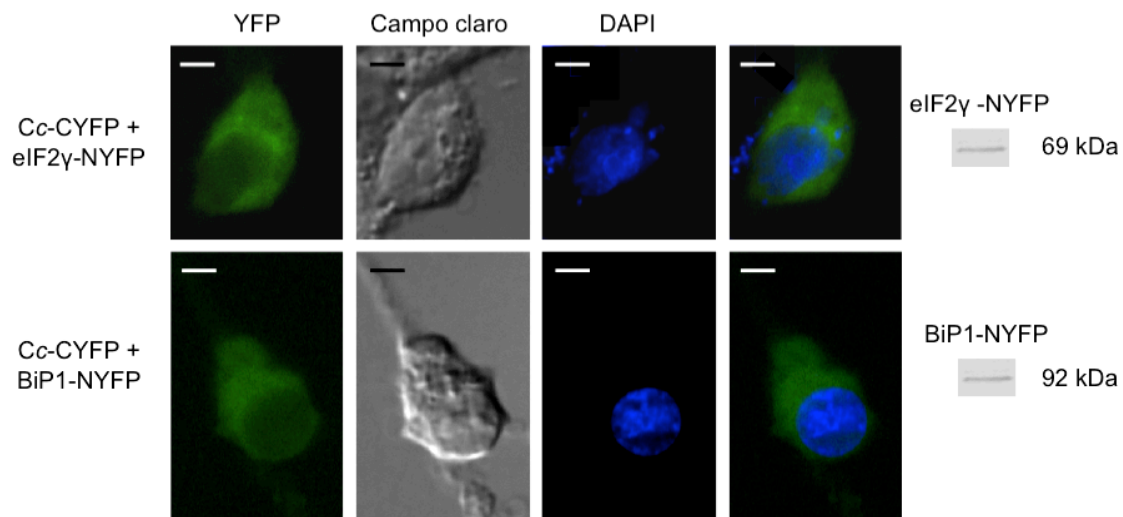
En este estudio, al igual que en las construcciones ensayadas en el caso de humanos, se emplearon además los vectores *pBiFC-bFosYC155* y *pBiFC-bJunYN155* como controles positivos, mientras que los vectores *pBiFC-bFosΔZipYC155* y *pBiFC-bJunYN155* sirvieron como controles negativos (Hu *et al.*, 2002), lo que se muestra en la Figura 79.



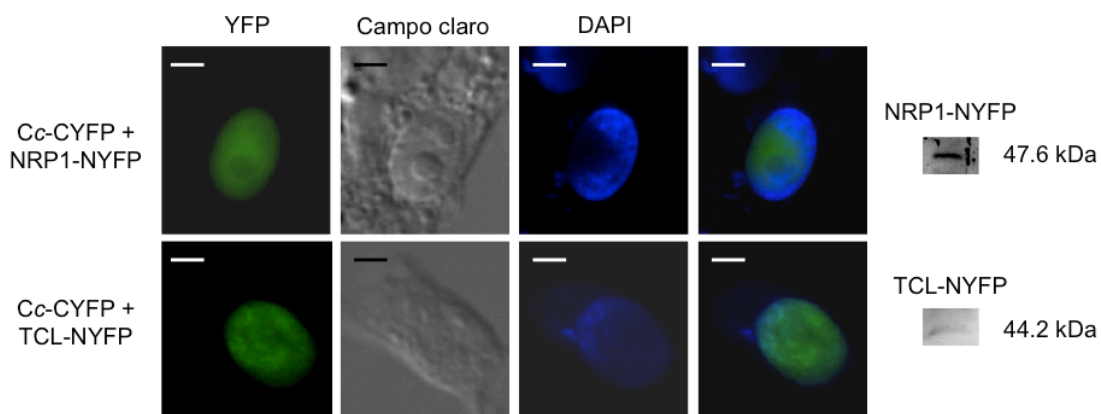
**Figura 79. Control positivo (*pBiFC-bFosYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) y control negativo (*pBiFC-bFosΔZIPYC155* y *pBiFC-bJunYN155*) empleados en la realización de los experimentos de BiFC de las dianas del Cc de *A. thaliana* en células HEK293T.** A la izquierda se muestra la señal debida a la reconstitución de la YFP, a continuación la célula en campo visible y el núcleo en azul mediante la tinción con DAPI. Finalmente (derecha) se muestra la superposición de la señal de la YFP + DAPI. La escala representa 5  $\mu$ m.

Las células HEK293T fueron transfectadas tal y como se explicó anteriormente en Materiales y Métodos (ver apartado 2.9.4). En la figura 80 se muestra el análisis de la interacción *in vivo* de eIF2 $\gamma$  y BiP1 con el Cc cuya interacción se produce a nivel citoplásmico, tal y como se deduce a partir de la reconstitución de la YFP.

Los complejos formados entre el Cc de *A. thaliana* y alguna de sus dianas (concretamente NRP1 y TCL), dieron lugar a la reconstitución de la YFP en el núcleo, lo que se puede determinar a partir del solapamiento que se produce entre la fluorescencia de la YFP y la del DAPI (marcador nuclear), lo que indica que la interacción entre el Cc y estas dianas se produce probablemente a nivel nuclear. La Figura 81 muestra el resultado del análisis de estas interacciones *in vivo* mediante BiFC.

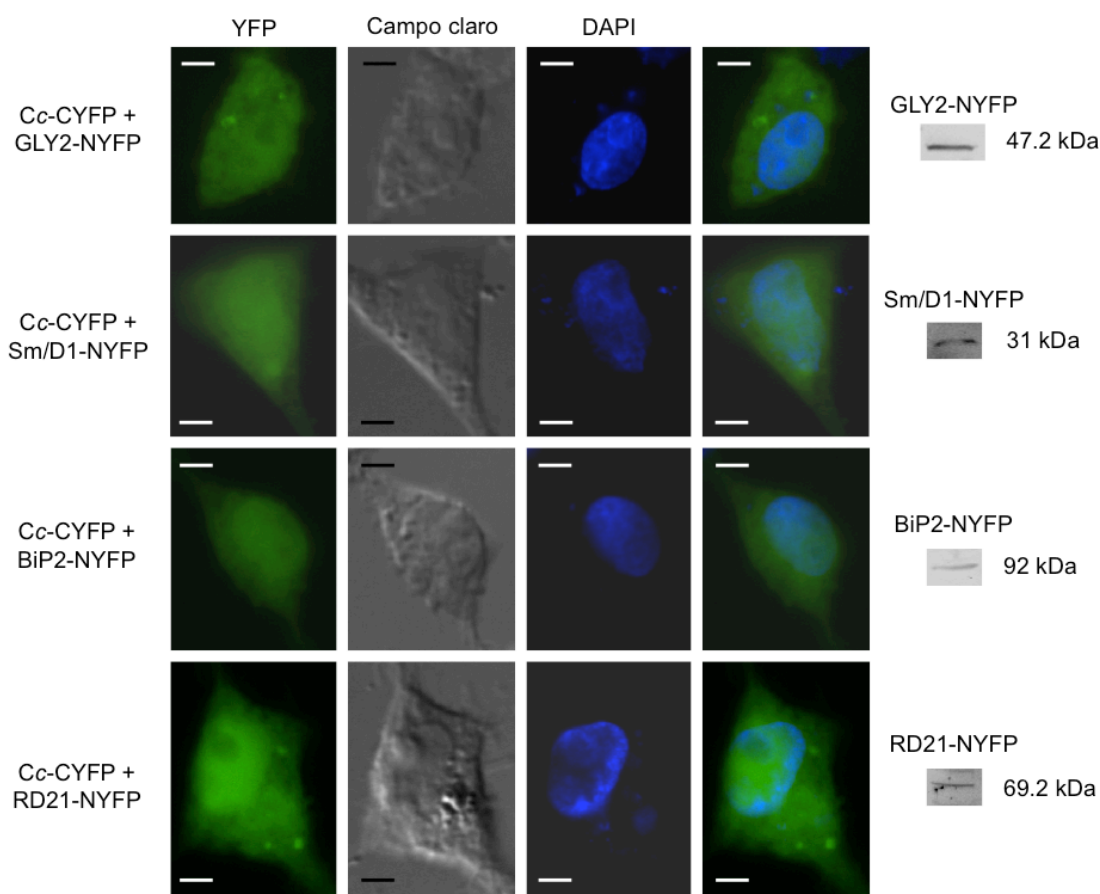


**Figura 80. Localización citoplásmica de las interacciones entre el Cc de *A. thaliana* y sus dianas eIF2 $\gamma$  y BiP1 determinada mediante BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 horas después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante western. La escala representa 5  $\mu$ m.



**Figura 81. Localización nuclear de las interacciones entre el Cc de *A. thaliana* y sus dianas NRP1 y TCL determinada mediante BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 horas después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante western. La escala representa 5  $\mu$ m.

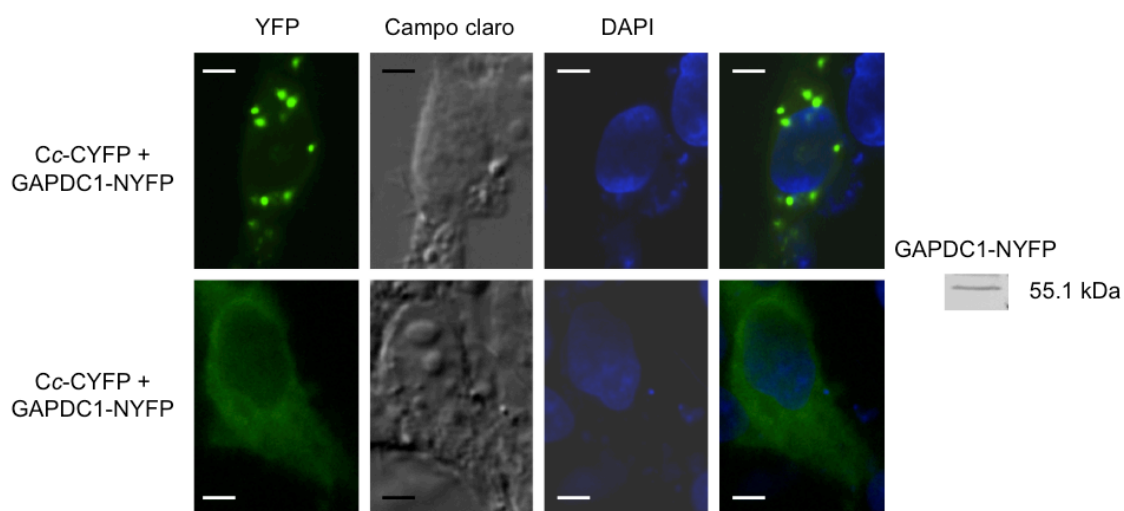
Igualmente, algunos de estos complejos, concretamente aquellos establecidos entre GLY2, Sm/D1, BiP2 o RD21 y el Cc de *A. thaliana* dieron lugar a señales núcleo-citoplásmicas, como se deduce a partir de la reconstitución de la fluorescencia de la YFP (Figura 82).



**Figura 82. Localización núcleo-citoplásmica de las interacciones entre el Cc de *A. thaliana* y alguna de sus dianas (GLY2, Sm/D1, BiP2 y RD21) determinada mediante BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M y analizadas 6 horas después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante western. La escala representa 5  $\mu$ m.

También resulta importante destacar que la interacción entre el Cc de *A. thaliana* y la GAPDC1 mostró dos posibles localizaciones. En condiciones

homeostáticas, es decir, antes de inducir apoptosis con CPT 10  $\mu$ M, la formación del complejo Cc-GAPDC1 presentaba un patrón punteado similar al mostrado en el caso del complejo Cc-ALDOA, lo que indica localización mitocondrial (Goldstein *et al.*, 2005). Es importante tener en cuenta que la localización mitocondrial de la GAPDH ha sido descrita anteriormente en mamíferos (Tarze *et al.*, 2007), estando implicada en la permeabilización mitocondrial que favorece la liberación de, entre otros, el Cc en condiciones apoptóticas. Sin embargo, en condiciones apoptóticas tras 6 horas de inducir apoptosis con CPT 10  $\mu$ M el complejo Cc-GAPDC1 se localizaba a nivel citoplásmico, como se deduce de la fluorescencia de la YFP (Figura 83), lo que coincidiría con la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol.



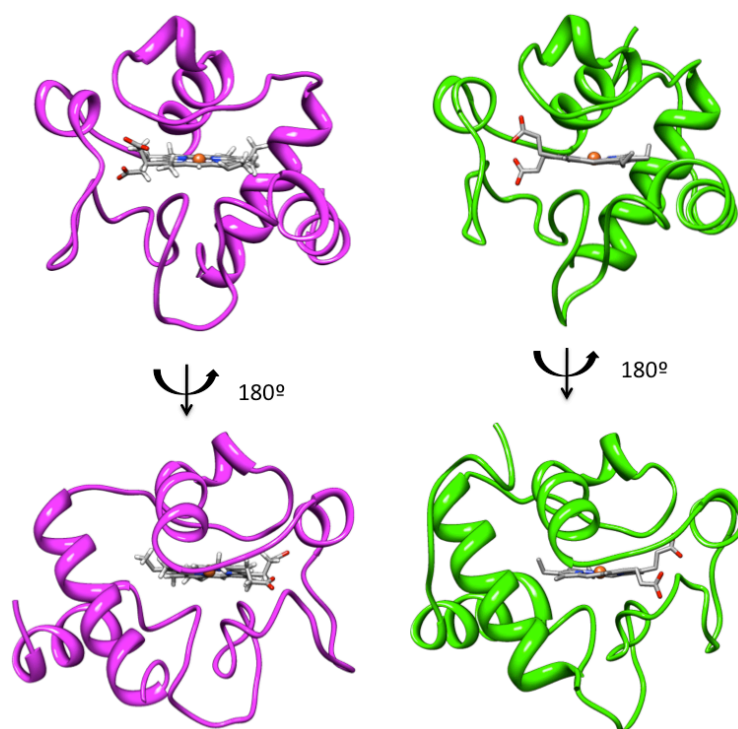
**Figura 83. Localización mitocondrial (0 horas) o citoplásmica (6 horas) de la interacción entre el Cc de *A. thaliana* y la GAPDC1 determinada mediante BiFC.** Las células transfectadas con las construcciones correspondientes fueron tratadas con CPT 10  $\mu$ M durante 6 horas (línea inferior) o no tratadas (línea superior) y analizadas después mediante microscopía de fluorescencia. A la derecha se muestra la banda correspondiente a la expresión de la proteína de fusión determinada mediante western. La escala representa 5  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados demuestran que la interacción del Cc de *A. thaliana* con sus nueve dianas aisladas por cromatografía de afinidad, identificadas mediante proteómica y ensayadas por BiFC en protoplastos, es igualmente reproducible mediante BiFC en células humanas HEK293T tras inducir apoptosis con CPT 10  $\mu$ M.

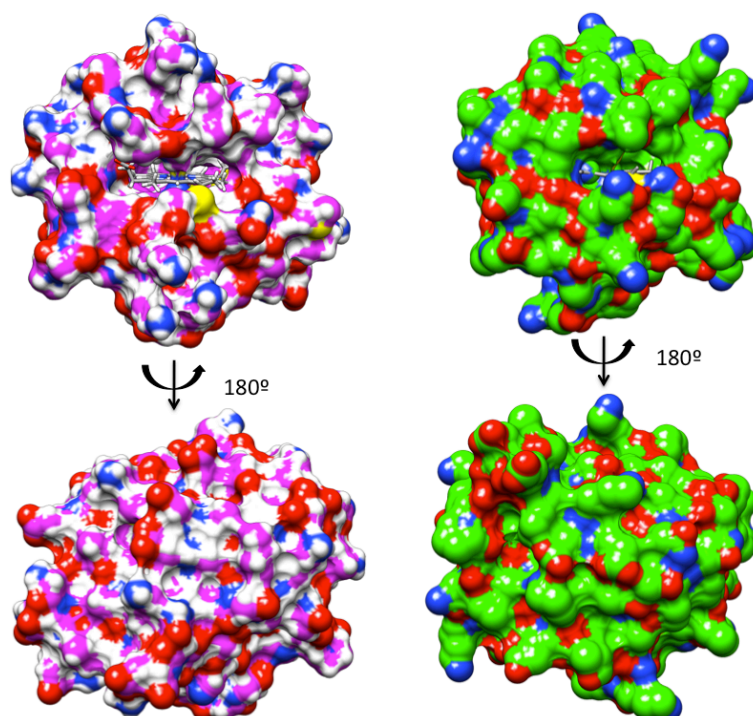
Es importante tener en cuenta que en todos los casos ensayados, la localización de la interacción determinada mediante la reconstitución de la YFP coincide tanto en protoplastos como en células HEK293T (Figuras 78, 80-83), salvo en el caso de NRP1 y TCL, que en protoplastos da lugar a una señal difusa por toda la célula (Figura 78), mientras que en HEK293T da una señal claramente nuclear (Figura 81). Esta diferencia respecto a la localización de los complejos puede tener múltiples explicaciones, como la diferencia en el inductor de PCD ( $H_2O_2$  vs. CPT), diferente tiempo de inducción de PCD (24 horas en protoplastos vs. 6 horas en HEK293T) o la diferencia de organismo (células de *A. thaliana* vs. células HEK293T)

### **3.4. Citocromo c: Una Proteína Estructuralmente Conservada a lo Largo de la Evolución**

El Cc respiratorio es una proteína ampliamente conservada a lo largo de la evolución (ver apartado 1.6, Introducción), tanto a nivel de secuencia (Figura 14) como a nivel de estructura (Figuras 84 y 85) (Baba *et al.*, 1981), desde plantas hasta humanos. Esto se relaciona con su papel esencial en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial entre los complejos III y IV (Figura 16).



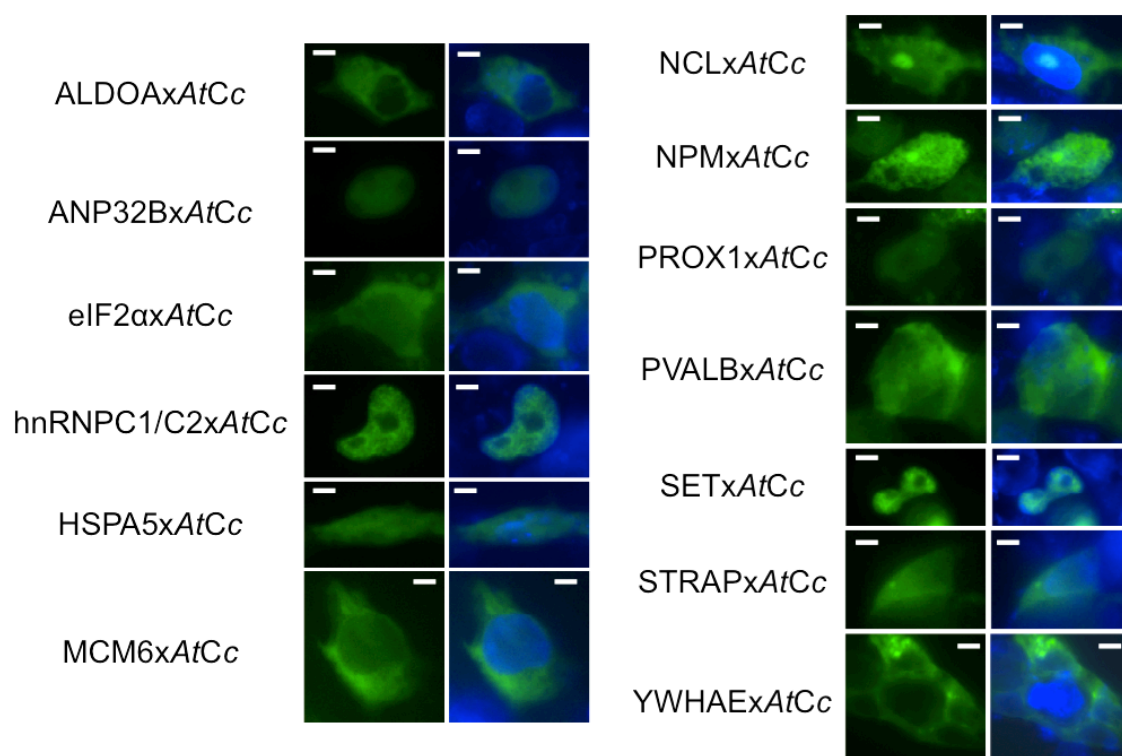
**Figura 84. Comparación de la estructura del Cc de *H. sapiens* y del Cc de *A. thaliana*.** A la izquierda, en magenta, se muestra el Cc de *H. sapiens* y a la derecha, en verde, el Cc de *A. thaliana*, mientras que el hemo en ambos casos aparece en color gris.



**Figura 85. Comparación de la estructura a nivel de superficie del Cc de *H. sapiens* y del Cc de *A. thaliana*.** A la izquierda se muestra la superficie del Cc de *H. sapiens*, mientras que a la derecha se muestra el Cc de *A. thaliana*.

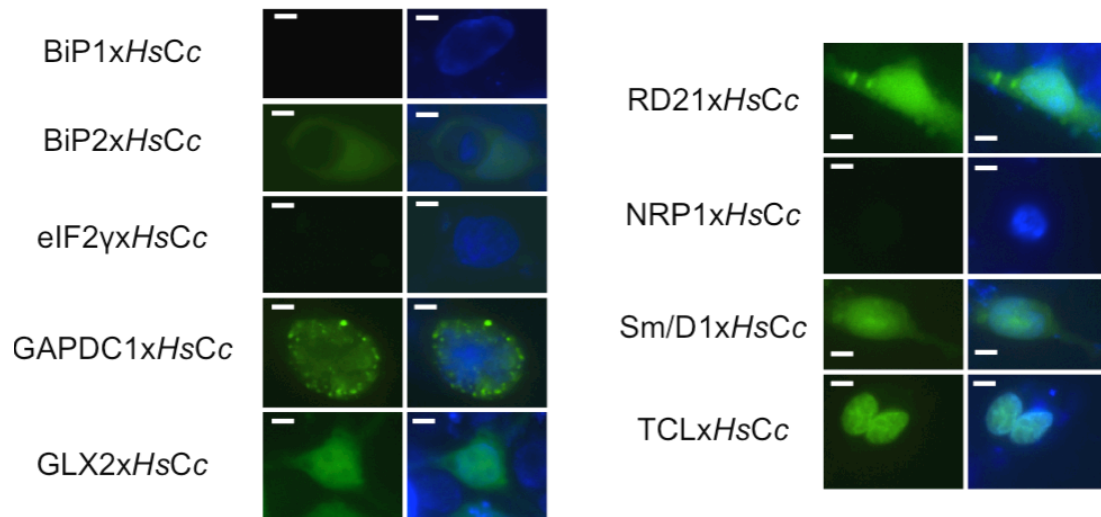


Con el objetivo de comprobar el grado de conservación entre ambas proteínas, en cuanto a su capacidad de reemplazarse en la interacción con las distintas dianas, se realizaron los cruces del Cc de *A. thaliana* y las dianas del Cc de *H. sapiens* y viceversa, analizando la interacción mediante BiFC. Para ello, las células HEK293T se transfectaron con las construcciones correspondientes y tras 24 horas se trataron con CPT 10  $\mu$ M durante 6 horas. Los resultados se muestran en las Figuras 86 y 87, respectivamente. Al igual que en los casos anteriores los vectores *pBiFC-bFosYC155* y *pBiFC-bJunYN155* se emplearon como controles positivos, mientras que los vectores *pBiFC-bFos $\Delta$ ZipYC155* y *pBiFC-bJunYN155* sirvieron como controles negativos (Hu *et al.*, 2002), lo que se muestra en la Figura 88.

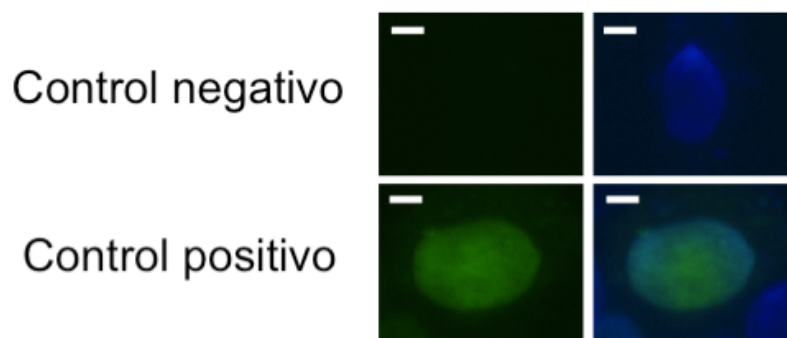


**Figura 86. Análisis mediante BiFC de la interacción del Cc de *A. thaliana* (AtCc) y las dianas del Cc de *H. sapiens*.** En todos los casos se muestra a la izquierda la fluorescencia correspondiente a la YFP, y a la derecha la imagen superpuesta de la fluorescencia del DAPI (núcleo) y la YFP. La escala representa 5  $\mu$ m.





**Figura 87. Análisis mediante BiFC de la interacción del Cc de *H. sapiens* (HsCc) y las dianas del Cc de *A. thaliana*.** En todos los casos se muestra a la izquierda la fluorescencia correspondiente a la YFP, y a la derecha la imagen superpuesta de la fluorescencia del DAPI (núcleo) y la YFP. La escala representa 5  $\mu$ m.



**Figura 88. Imágenes mostrando tanto el control positivo (*pBiFC-bFosYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) como el control negativo (*pBiFC-bFosΔZipYC155* + *pBiFC-bJunYN155*) usado en los ensayos de BiFC.** A la izquierda se muestra la señal debida a la reconstitución de la YFP, y a la derecha la superposición de la señal de la YFP y el núcleo teñido con DAPI. La escala representa 5  $\mu$ m.

Como se muestra en las Figuras 86 y 87, ambos citocromos son capaces de reemplazarse mutuamente en la interacción con la mayoría de las dianas identificadas en este trabajo, con la excepción de tres dianas del Cc de *A.*

*thaliana* (BiP1, eIF2 $\gamma$  y NRP1), las cuales no son capaces de interaccionar con el Cc de *H. sapiens*, como se deduce a partir de la ausencia de señal por parte de la YFP (Figura 87). Por el contrario, todas las dianas identificadas en el caso del Cc de *H. sapiens* se mostraron capaces de interaccionar con el Cc de *A. thaliana* (Figura 86).

La existencia de tres dianas del Cc de *A. thaliana* que no son reconocidas por el Cc de *H. sapiens*, a pesar de que ambos citocromos comparten un alto grado de identidad (66 %), se puede explicar en base a las pequeñas diferencias existentes entre ambos citocromos, las cuales residen principalmente en el extremo amino terminal, como se muestra en la Figura 89.

```

H. sapiens      -----MGDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGYSYTAA 52
A. thaliana     MASFDEAPPGNPKAGEKIFRTKCAQCHTVEKGAGHKQGPNLNGLFGRQSGTTPGYSYSAA 60
                  *: : *:*** **:*****. ** *****:*** :*****:**

H. sapiens      NKNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIPGTMIFVGIKKKEERADLIAYLKATNE 105
A. thaliana     NKSMVNWEEKTYDYLLNPKKYIPGTMVFPGLKKPQDRADLIAYLKEGTA- 112
                  **. .: * *.** **:*****:* *:** :*****:.*

```

**Figura 89. Identidad del Cc de *H. sapiens* y el Cc de *A. thaliana*.** Comparación del grado de conservación a nivel de secuencia de ambos citocromos.

## 4. DISCUSIÓN

*“By the time I was born, more of me died than survived. It was no wonder I cannot remember; during that time I went through brain after brain for nine months, finally contriving the one model that could be human, equipped for language.”*

*(Lewis Thomas)*



## 4.1. Papel del Citocromo c en la Apoptosis de Mamíferos

### 4.1.1. Introducción

Las funciones desempeñadas *in vivo* por muchos de los componentes implicados en la ruta de señalización apoptótica, tales como los miembros de la familia Bcl-2, las caspasas y APAF1, han podido ser establecidas mediante una aproximación genética (revisado por Elmore, 2007). Sin embargo, esta aproximación ha sido escasamente empleada en el caso concreto del Cc, con la excepción de dos trabajos que conducen a diferentes conclusiones (Li *et al.*, 2000, Vempati *et al.*, 2007), debido al papel esencial que desempeña durante la respiración mitocondrial.

En el caso del trabajo realizado por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2000) se obtuvo una línea celular *knockout* para el Cc, la cual mostraba resistencia a los inductores de la ruta apoptótica intrínseca, mientras que manifestaban una sensibilidad aumentada a los inductores de la ruta extrínseca. Posteriormente, Vempati y colaboradores (Vempati *et al.*, 2007) demostraron que la línea celular desarrollada por el grupo de Li estaba expresando un isoforma del Cc específica de testículos. Por lo que Vempati y colaboradores eliminaron ambas isoformas del Cc, observando que la línea celular resultante era resistente a ambos tipos de inductores, tanto a inductores de la ruta apoptótica intrínseca como a inductores de la extrínseca.

Este papel central del Cc en la activación de la PCD sólo ha podido ser establecido en el caso de mamíferos, aunque resulta interesante tener en cuenta que la liberación del Cc desde la mitocondria hacia el citosol ha sido descrita en una enorme variedad de organismos, como levaduras (Giannattasio

*et al.*, 2008), plantas (Balk *et al.*, 1999), moscas (Arama *et al.*, 2006) y mamíferos (Liu *et al.*, 1996), siendo un evento altamente conservado a lo largo de la evolución.

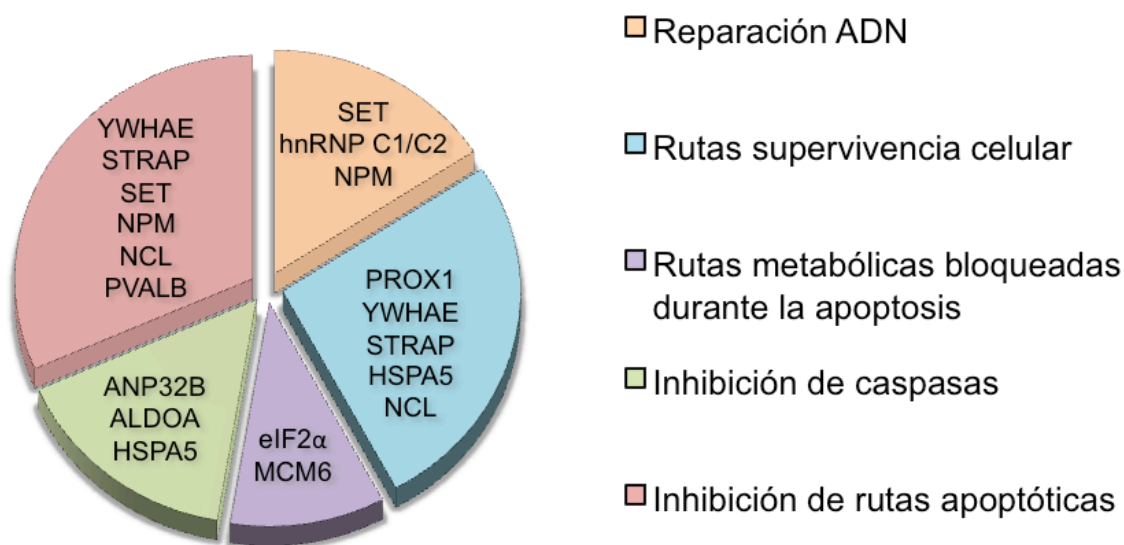
Igualmente, resulta interesante el hecho de que en torno al 90 % del Cc de la mitocondria se encuentra secuestrado en el interior de las crestas mitocondriales, no estando de este modo disponible para el transporte electrónico (Delivani y Martin, 2006). Por otra parte, la interacción del Cc con APAF1 ocurre aguas arriba de la cascada de señalización, provocando la activación de las caspasas iniciadoras que activan a las caspasas efectoras, lo que provoca la amplificación de la señal apoptótica, de modo que *a priori* la cantidad de Cc necesaria para la activación de esta cascada de señalización debería de ser pequeña. Teniendo en cuenta ambos aspectos, la concentración de Cc en el espacio intermembrana de la mitocondria (0,5-5 mM, Forman y Azzi, 1997) resulta extremadamente alta, por lo que surge la pregunta acerca de si el Cc podría estar implicado de algún modo en la regulación de otros procesos durante la PCD, aparte de la activación de la cascada proteolítica.

Aparte de esta función, bien establecida *in vitro* del Cc durante la apoptosis en mamíferos, recientemente se han propuesto nuevas posibles funciones para el Cc durante la apoptosis, basadas en la detección del Cc en otros compartimentos. Mientras que algunos grupos sugieren que el Cc participa exclusivamente en la formación del apoptosoma y, consecuentemente, en la activación de las caspasas (Solary *et al.*, 2008), otros grupos han propuesto recientemente que el Cc durante la apoptosis es translocado tanto al núcleo (Nur-E-Kamal *et al.*, 2004) como al retículo endoplásmico (Boehning *et al.*,

2005), lo que abre la posibilidad a nuevas funciones, aún no exploradas, del Cc durante la apoptosis.

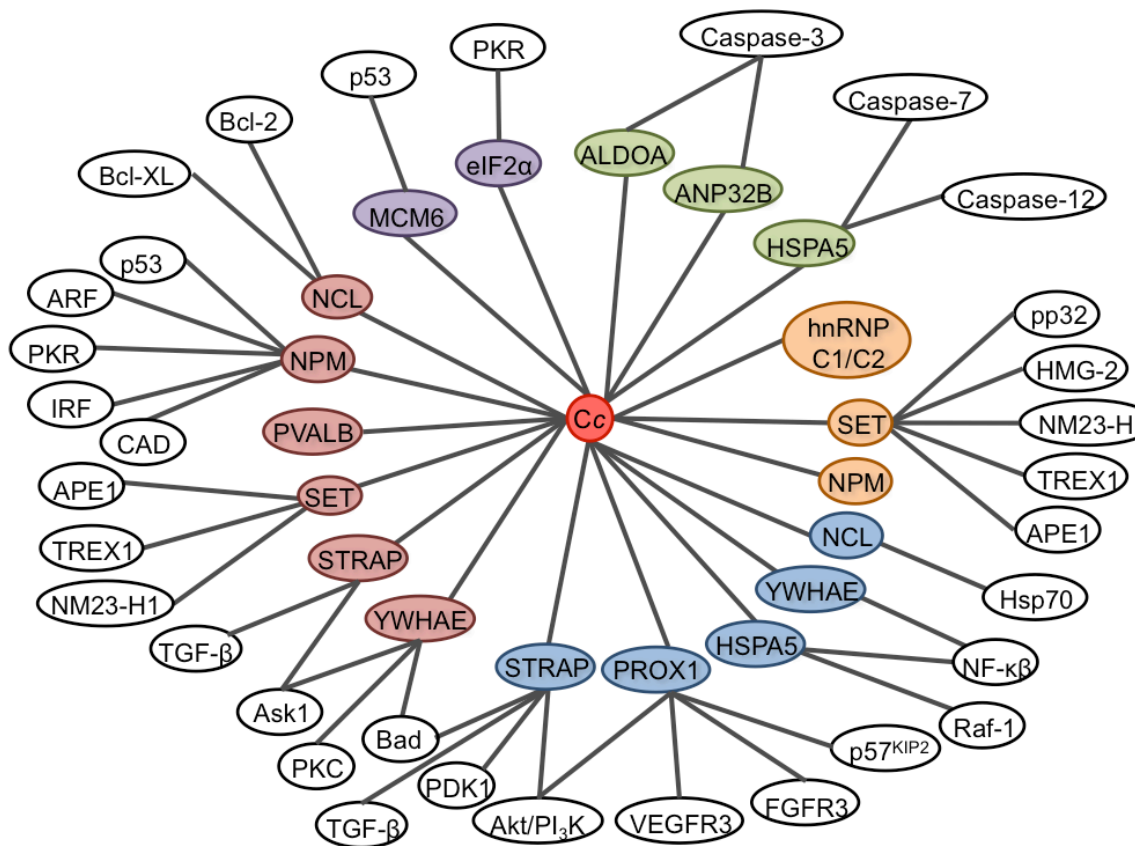
#### 4.1.2. Red de Interacciones del Citocromo c Durante la Apoptosis

Este estudio ha permitido identificar al Cc de *H. sapiens* como una proteína promiscua, capaz de interactuar con al menos 13 dianas durante la apoptosis, actuando como la pieza central de una compleja red regulatoria. En la Figura 90 se muestran las principales funciones de las proteínas identificadas en este trabajo como dianas del Cc de *H. sapiens*, usando para ello un diagrama dividido en cinco grupos funcionales, dentro de los cuales se pueden asignar estas proteínas en base a las funciones descritas para cada una de ellas en la literatura.



**Figura 90. Principales funciones de las nuevas dianas del Cc de *H. sapiens*.** Las dianas del Cc de *H. sapiens* identificadas en este trabajo se pueden clasificar en 5 grandes grupos funcionales, aunque una misma proteína puede aparecer en varios grupos funcionales a la vez.

En la Figura 91 se muestra la compleja red de interacciones en las que el Cc de *H. sapiens* se encuentra implicado, como se puede deducir a partir de los datos obtenidos en este trabajo.



**Figura 91. Red de interacciones del Cc de *H. sapiens*.** Esquema del entramado de interacciones que establece el Cc de *H. sapiens* con las dianas identificadas en este trabajo. El código de colores es el mismo empleado en la figura 90.

Como se mostraba en la figura 90, las dianas del Cc de *H. sapiens* identificadas en este trabajo se pueden clasificar en cinco grandes grupos funcionales (Reparación del ADN, Rutas de supervivencia celular, Rutas metabólicas bloqueadas durante la apoptosis, inhibición de caspasas e inhibición de rutas apoptóticas), tal y como se explica a continuación.



#### **4.1.2.1. Dianas implicadas en la Reparación del ADN**

##### **4.1.2.1.1. SET**

El complejo SET se encuentra constituido por las proteínas SET, pp32, HMG-2, APE1, NM23-H1 y TREX1 (Chowdhury *et al.*, 2006) (Figura 91). Se ha demostrado que, bajo condiciones homeostáticas, el complejo SET se localiza asociado al retículo endoplásmico, pero que en respuesta a estrés oxidativo es movilizado hacia el interior del núcleo (Chowdhury *et al.*, 2006). Asimismo, se ha propuesto que el complejo SET podría estar implicado en la reparación de fenómenos de rotura de ADN monocatenario, los cuales aparecen en condiciones de estrés oxidativo. Esta función se realizaría mediante un mecanismo conocido como excisión de base (Dempsey y DeMott, 2002), a través de alguno de los miembros del complejo, concretamente APE1 y, posiblemente, TREX1 y NM23-H1 (Chowdhury *et al.*, 2006).

##### **4.1.2.1.2. NPM y hnRNP C1/C2**

Las roturas de doble cadena de ADN pueden ser generadas por factores externos – inhibidores de la topoisomerasa (por ej. CPT) –, aunque también se producen en condiciones fisiológicas – durante la replicación del ADN. A lo largo de la evolución se ha producido el desarrollo tanto de los mecanismos para la detección de daño en el ADN como para la activación de los mecanismos de reparación de ADN, así como de los puntos de control del ciclo celular (Sancar *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que tanto NPM como hnRNP C1/C2 son capaces de unirse a la cromatina en respuesta a

daños de doble cadena en el ADN, jugando un papel clave en la reparación del ADN y/o en la respuesta al daño (Lee *et al.*, 2005) (Figura 92).

#### **4.1.2.2. Rutas de Supervivencia Celular**

##### **4.1.2.2.1. PROX1**

La proteína PROX1 es un factor transcripcional implicado en el control del desarrollo de la vasculatura linfática (Wigle y Oliver, 1999). De forma reciente se ha conseguido demostrar que PROX1 es una diana de SUMO-1, y que esta sumoilación modula tanto su unión al ADN como su actividad transcripcional (Pan *et al.*, 2009). Asimismo se ha observado que la sobreexpresión de PROX1 parece provocar la sobreexpresión de marcadores de supervivencia celular y proliferación, tales como VEGFR3 (Karpanen y Alitalo, 2008), FGFR3 (Kang *et al.*, 2007) y p57 (Chang *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que PROX1 facilita la supervivencia celular y la proliferación a través de la ruta de señalización de AKT (Xu, 2010) (Figura 92).

##### **4.1.2.2.2. YWHAE**

Las proteínas de la familia 14-3-3 están implicadas en la regulación de un amplio rango de procesos celulares, tales como respuestas inflamatorias, señalización mitogénica y de supervivencia celular, ciclo celular, actividad transcripcional, replicación del ADN, respuesta frente a daño en el ADN y apoptosis (Zuo *et al.*, 2010). YWHAE es un miembro citoplasmático de esta familia, que ha sido implicado en la regulación de múltiples rutas de señalización de supervivencia celular, tales como TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B y PI-3K/AKT (Tzivion *et al.*, 2006).

#### 4.1.2.2.3. STRAP

Se ha conseguido identificar a STRAP como una de las dianas de PDK1 (Seong *et al.*, 2005). En este estudio se demostró que la co-expresión de PDK1 y STRAP es capaz de suprimir la muerte celular apoptótica. Estos resultados sugieren que STRAP desempeña un papel importante en la modulación de la ruta de señalización de supervivencia mediada por PDK1. Además, STRAP no sólo regularía a PDK1 de forma positiva, sino que además parece estar regulando la actividad de las dianas de PDK1, activando a AKT e inhibiendo a Bad (Seong *et al.*, 2005), promoviendo de este modo la supervivencia celular (Figura 92).

#### 4.1.2.2.4. HSPA5

La chaperona HSPA5 se localiza principalmente en el lumén del retículo endoplásmico, aunque en menor medida también ha podido ser detectada en el citosol, en el núcleo y en la superficie celular (Rao *et al.*, 2002, Reddy *et al.*, 2003, Shani *et al.*, 2008). En condiciones de estrés del retículo endoplásmico (por ej. acumulación de proteínas mal plegadas), se ha propuesto que HSPA5 es liberada desde el retículo endoplásmico hacia el citosol, donde parece interaccionar con el complejo IKK (Shkoda *et al.*, 2007), promoviendo de este modo la supervivencia y la proliferación celular a través de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, se ha demostrado que HSPA5 es capaz de interaccionar físicamente con Raf-1, la cual ha sido descrita como la responsable de la fosforilación e inactivación de Bad, lo que resulta en la resistencia de las células a la apoptosis (Jin *et al.*, 2005), la estabilización de la membrana mitocondrial y la

inhibición de la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico (Shu *et al.*, 2008) (Figura 92).

#### 4.1.2.2.5. NCL

Se sabe que la chaperona HSP70 está implicada en la protección de las células frente a la apoptosis inducida por medio de muy diversos factores, como por ejemplo: choque térmico, TNF- $\alpha$ , ausencia de factores de crecimiento, estrés oxidativo o radiación (Arya *et al.*, 2007). Recientemente, se ha demostrado que NCL actuaría aguas abajo como efector de HSP70 en la protección de las células contra la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Jiang *et al.*, 2010).

#### 4.1.2.3. Rutas Metabólicas Bloqueadas Durante la Apoptosis

##### 4.1.2.3.1. eIF2 $\alpha$

Se ha propuesto que la inhibición de la síntesis de proteínas es capaz de provocar un aumento en la apoptosis mediada por diferentes estímulos (Polunovsky *et al.*, 1994). Bajo condiciones apoptóticas, se ha demostrado que eIF2 $\alpha$  es fosforilada por PKR, y que esta modificación post-traducciona de eIF2 $\alpha$  provoca una inhibición de la traducción durante la apoptosis (Saelens *et al.*, 2001), lo que constituye un evento esencial para el inicio de la autofagia (Kouroku *et al.*, 2007).

##### 4.1.2.3.2. MCM6

MCM6 es uno de los miembros del complejo MCM (del inglés, *MiniChromosome Maintenance*) y un componente clave del complejo de pre-

replicación (pre-RC), el cual es necesario para la iniciación de la síntesis del ADN en organismos eucariotas (Lei y Tye, 2001). Durante el ciclo celular, se ha demostrado que el complejo MCM es fosforilado, lo que produce la activación de la replicación del ADN. Por el contrario, tras daños en el ADN, p53 es activado e inhibe la replicación del ADN (Cox *et al.*, 1995), reprimiendo los genes que codifican para las proteínas MCM (Kho *et al.*, 2004) y regulando la estabilidad de las proteínas que forman parte del complejo pre-RC (Duursma y Agami, 2005).

#### **4.1.2.4. Inhibición de las Caspasas**

##### **4.1.2.4.1. ANP32B**

ANP32B está implicada en la regulación de la expresión génica, bien actuando como una chaperona de histonas o bien modulando el tráfico del ARNm sirviendo como un ligando de HuR (She *et al.*, 2010). Además, ANP32B puede actuar como un inhibidor de la caspasa-3, ya que el bloqueo de la expresión de ANP32B mediante ARNi causa un aumento en la activación de la caspasa-3 y promueve la apoptosis (She *et al.*, 2010). Por otro lado, la sobreexpresión de ANP32B es capaz de provocar el rescate de células Rat1 de la apoptosis (Sun *et al.*, 2006).

##### **4.1.2.4.2. ALDOA**

ALDOA es una enzima glucolítica que se encuentra implicada en la conversión de fructosa-1,6-bifosfato en dihidroxiacetonafofato y gliceraldehido-3-fosfato (Yao *et al.*, 2004). Recientemente se ha propuesto que el gliceraldehido-3-fosfato, aparte de ser uno de los intermediarios de la glucólisis, es capaz de

actuar como un inhibidor reversible y no-competitivo de la caspasa-3 (Jang *et al.*, 2009).

#### **4.1.2.4.3. HSPA5**

La chaperona del retículo endoplásmico HSPA5, también denominada como GRP78 (del inglés, ***Glucose Regulated Protein 78***) está implicada en el correcto plegamiento y ensamblaje de las proteínas en el retículo endoplásmico (Lee, 2005). Se ha demostrado que su síntesis se estimula en condiciones de estrés que afectan al funcionamiento normal del retículo endoplásmico y a la homeostasis del calcio (Lee, 2005). Además, se ha descrito que una subpoblación de HSPA5 se encuentra como proteína transmembrana en el retículo endoplásmico, estando implicada en el bloqueo de la activación de la caspasa-7. Aparte, se ha descrito que HSPA5 está formando un complejo inhibitorio con la caspasa-12, impidiendo de esta manera su liberación del retículo endoplásmico (Rao *et al.*, 2002) y de este modo bloqueando la apoptosis (Figura 92).

#### **4.1.2.5. Inhibición de Rutas Apoptóticas**

##### **4.1.2.5.1. YWHAE y STRAP**

Aparte del papel descrito para YWHAE y STRAP como reguladores positivos de las rutas de supervivencia celular (ver apartado 4.1.2.2, Discusión), ambas proteínas se encuentran implicadas en la inhibición de las rutas apoptóticas secuestrando proteínas pro-apoptóticas. Mientras que YWHAE es capaz de interaccionar y secuestrar a Bad (Won *et al.*, 2003), PKC (Supekova *et al.*, 2002) y Ask1 (Subramanian *et al.*, 2004), se ha descrito que STRAP coopera

con Smad7 en la inhibición de la señalización de TGF- $\beta$ , bloqueando de este modo la apoptosis (Datta y Mosses, 2000). Además, recientemente se ha propuesto una nueva función inhibitoria para STRAP en la apoptosis inducida por Ask1 (Jung *et al.*, 2010).

#### 4.1.2.5.2. SET

Las nucleasas APE1, NM23-H1 y TREX1, que en condiciones homeostáticas forman parte del complejo SET implicado en la reparación del ADN, son activadas durante la apoptosis como consecuencia del procesamiento proteolítico de SET por parte de la granzima A o de la granzima K, lo que conduce a la aparición de daños de cadena simple en el ADN (Chowdhury *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2007) y, por lo tanto, a la activación de un proceso apoptótico.

#### 4.1.2.5.3. NPM

Se ha descrito que las proteínas supresoras de tumores (por ej. p53) son capaces de inhibir el crecimiento de células dañadas a través de la activación de la parada del ciclo celular y la inducción de la apoptosis (Miyashita y Reed, 1995). Asimismo, se ha propuesto que NPM actúa como inhibidor de la apoptosis inducida por p53, al impedir la translocación de p53 a la mitocondria (Dhar y St. Clair, 2009) y al provocar una disminución de la cantidad de p53 activa (Li *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que NPM está implicada en la regulación de un amplio número de rutas apoptóticas de señalización (Grisendi *et al.*, 2006).

#### **4.1.2.5.4. NCL**

La familia de proteínas Bcl-2 está formada por reguladores clave de la apoptosis, los cuales desempeñan funciones tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas (ver apartado 1.3.3.4, Introducción). Tanto Bcl-XL como Bcl-2 actúan como proteínas anti-apoptóticas (Adams y Cory, 2002). Recientemente se ha propuesto que NCL actúa como proteína anti-apoptótica, al estar implicada en la estabilización del ARNm de Bcl-XL (Zhang *et al.*, 2008) y de Bcl-2 (Sengupta *et al.*, 2004), por lo tanto conduciendo a un aumento en la cantidad de estas proteínas en las células y, por consiguiente, a la inhibición de la apoptosis.

#### **4.1.2.4.5. PVALB**

Actualmente está ampliamente aceptado que un aumento en la cantidad de calcio, o una perturbación de la compartimentalización del calcio intracelular, puede provocar citotoxicidad y apoptosis (Orrenius *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que simplemente un aumento supramicromolar de calcio libre en el interior celular es suficiente para inducir apoptosis (Tombal *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la PVALB, una proteína de unión a calcio implicada en el tamponamiento del calcio intracelular, al ser sobreexpresada es capaz de bloquear la apoptosis, gracias a su capacidad tamponadora de calcio (Dekkers *et al.*, 2004).

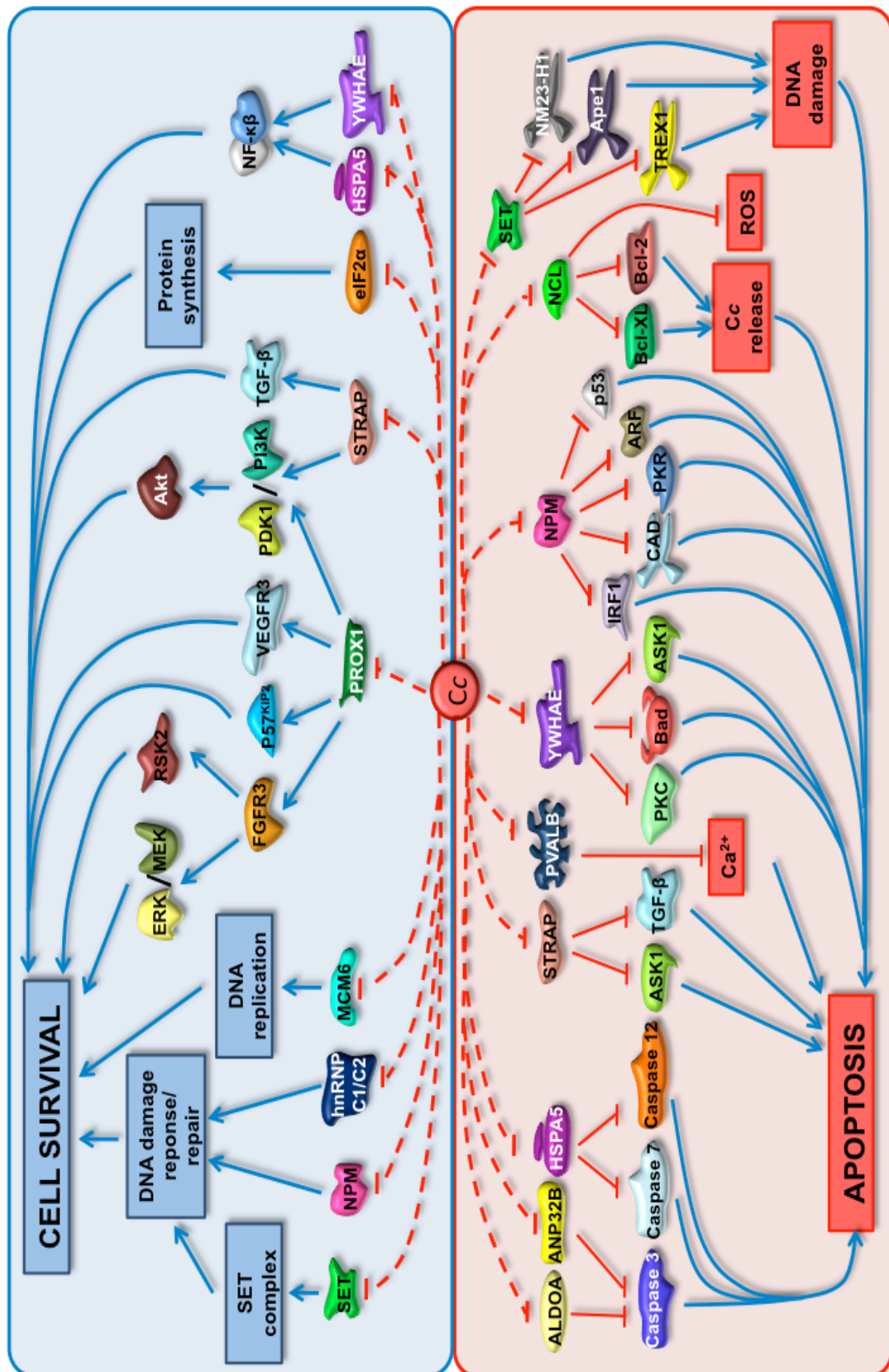
#### **4.1.3. El Citocromo c. Regulador Maestro de la Apoptosis**

El destino de una célula depende del equilibrio existente entre las rutas de señalización pro-apoptótica y de supervivencia celular. Los resultados de esta



tesis nos permiten proponer un modelo en el que el Cc interacciona con una plétora de dianas, implicadas tanto en procesos pro-apoptóticos como anti-apoptóticos, evitando la coexistencia, tanto temporal como espacial, de señales de supervivencia celular y pro-apoptóticas. De este modo, el Cc parece ser el responsable de permitir que la apoptosis progrese de forma correcta, bloqueando las rutas de supervivencia celular y desbloqueando las rutas pro-apoptóticas, evitando que la célula termine derivando hacia un proceso necrótico (Figura 92). Algunas de las dianas del Cc aquí propuestas están implicadas en los mecanismos de respuesta y/o reparación frente a daño en el ADN, en la síntesis de proteínas, en las rutas de supervivencia y en procesos esenciales para el crecimiento de células en condiciones homeostáticas. Otras dianas del Cc actúan bloqueando la apoptosis, inhibiendo las caspasas o afectando señales pro-apoptóticas, tales como la liberación citoplásmica del Cc o el calcio. Algunas de estas nuevas dianas actúan tanto en rutas de supervivencia celular como en rutas pro-apoptosis, concretamente SET, YWHAЕ, NPM, STRAP y HSPA5.

El efecto inhibitorio que proponemos para el Cc sobre sus dianas se pone de manifiesto al sobreexpresar PVALB o NPM, como se representa en las figuras 68 y 69 (ver apartado 3.2.6, Resultados). Se ha descrito que tanto PVALB como NPM son capaces de rescatar células de la apoptosis inducida por un aumento en la concentración citoplásmica de calcio, o causada por daños en el ADN, respectivamente (Dekkers *et al.*, 2004, Dhar y St. Clair., 2009). Sin embargo, la co-expresión y la interacción de cualquiera de estas dianas con el Cc silencia su función anti-apoptótica (Figura 92).

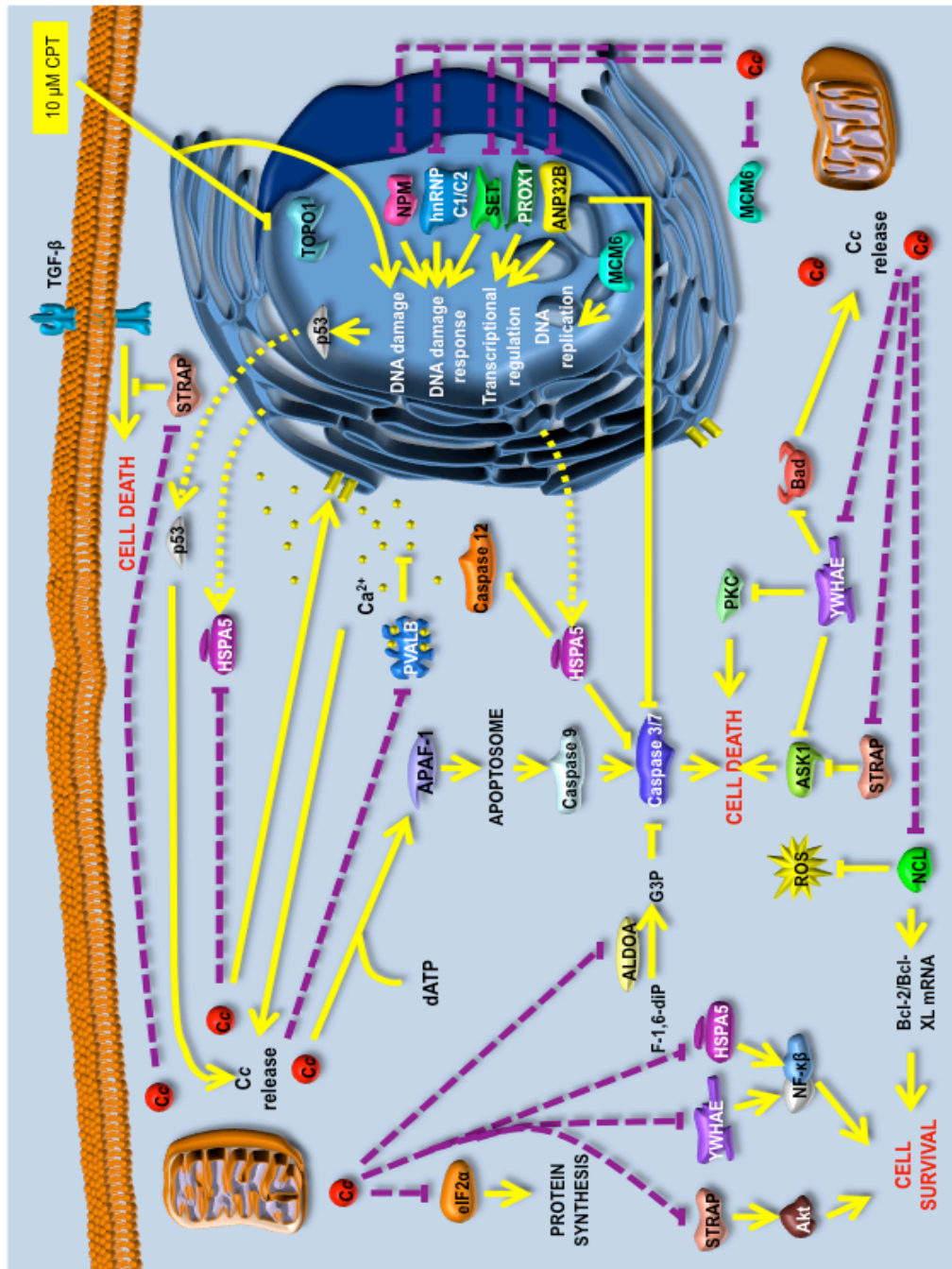


**Figura 92. Doble papel del Cc durante la apoptosis en mamíferos.** El Cc, una vez liberado de la mitocondria, actúa como inhibidor de rutas de supervivencia celular y como promotor de factores implicados en el bloqueo de la apoptosis.

En resumen, proponemos que el Cc durante la apoptosis en mamíferos constituye una pieza central en el control del fino equilibrio que regula la vida y la muerte, siendo el responsable, al menos en parte, de causar un desbalance en este estado de equilibrio desde la supervivencia celular hacia la apoptosis.

#### **4.1.4. Apoptosis en Mamíferos. Una Compleja Red de Interacciones del Citocromo c**

Esta nueva red de interacciones en las que el Cc se encuentra implicado, tal y como se propone en este trabajo, está además apoyada por la apropiada localización celular de los diferentes componentes (Figura 93). Estos datos nos permiten establecer que el Cc, aparte del papel que desempeña en la ruta apoptótica intrínseca -formación del apoptosoma y activación de las caspasas-, desempeña otra serie de funciones igualmente esenciales. El Cc no sólo interacciona con proteínas citosólicas (PVALB, YWHAE, STRAP, NCL, ALDOA y eIF2 $\alpha$ ), sino también con proteínas de otros orgánulos que son translocadas al citosol tras un estímulo apoptótico (HSPA5). Otras dianas del Cc son por el contrario proteínas nucleares (NPM, hnRNP C1/C2, SET, PROX1 y ANP32B), siendo proteínas implicadas en la respuesta frente a daños en el ADN, la replicación del ADN y la regulación transcripcional. En el caso de MCM6, la interacción con el Cc ocurre en el citoplasma, tal y como se deduce a partir de los datos de BiFC, aunque su liberación desde el núcleo hacia el citoplasma no ha sido demostrada. Estos datos proponen por primera vez una posible función para el Cc a nivel nuclear, explicando la translocación nuclear del Cc en condiciones apoptóticas que se ha propuesto recientemente (Ruíz-Vela *et al.*, 2002; Nur-E-Kamal *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2009).



**Figura 93. Esquema de la red de interacciones del Cc en condiciones apoptóticas en células de mamíferos mostrando la localización de los complejos.** El Cc, en condiciones apoptóticas, es liberado desde la mitocondria hacia el citosol, donde sirve como regulador central de una compleja red de interacciones. En el esquema se muestra la localización celular de los complejos, tal y como se deduce de los datos *in vivo* obtenidos por BiFC. Las interacciones establecidas en la bibliografía se representan mediante líneas continuas en amarillo, las translocaciones se muestran con líneas punteadas en amarillo, y en líneas discontinuas en morado se muestran las interacciones establecidas a partir de los datos obtenidos en este trabajo.

De acuerdo con esta propuesta de nuevas dianas y funciones del Cc, nuestros datos indican que el Cc actúa en otros procesos fisiológicos, más allá del transporte de electrones en condiciones homeostáticas, o de la formación del apoptosoma durante la apoptosis. El Cc constituye la pieza central en el control de una compleja red regulatoria de interacciones, que permite bloquear las rutas de supervivencia celular, permitiendo asimismo desbloquear la apoptosis.

#### 4.1.5. Implicaciones Evolutivas de esta Red de Interacciones

En el caso de *D. melanogaster* existen dos formas del Cc, el Cc proximal y el Cc distal. En el caso del Cc proximal resulta imposible obtener mutantes, debido a que resulta esencial para la respiración, pero ha sido posible obtener mutantes *knockout* del Cc distal, que presentan un profundo retraso de la apoptosis (Mendes *et al.*, 2006; Arama *et al.*, 2006). Estos resultados indican la existencia de algún tipo de papel alternativo para el Cc en la apoptosis de *D. melanogaster*, dado que el Cc parece no ser esencial para el ensamblaje del apoptosoma en *D. melanogaster* (Yu *et al.*, 2006) (ver apartado 1.7.2, Introducción).

Aparte, las nuevas dianas descritas en este trabajo para el Cc durante la apoptosis nos permiten entender por qué la apoptosis se desarrolla de forma normal a través de la ruta extrínseca en mutantes *knockout* de APAF1 (Meier *et al.*, 2000; Marsden *et al.*, 2002; Adams, 2003; Shawgo *et al.*, 2009), mientras que los mutantes *knockout* de Cc son resistentes tanto a la ruta intrínseca como a la ruta extrínseca (Vempati *et al.*, 2007). Estos fenotipos diferenciales no pueden ser explicados si el Cc únicamente interacciona con APAF1 durante la apoptosis, pero pueden ser fácilmente armonizados si asumimos un papel

mas amplio y mas importante para el Cc durante la apoptosis, desbloqueando las rutas de señalización apoptóticas e inhibiendo la supervivencia celular.

Los datos obtenidos en este trabajo desvelan un papel multifuncional para el Cc citosólico durante las fases iniciales de la apoptosis, abriendo nuevas vías que nos permitan entender la PCD en otros organismos en los que APAF1 está ausente (por ej. *A. thaliana*), o en los que el ensamblaje del apoptosoma parece independiente del Cc (por ej. *D. melanogaster* o *C. elegans*). Si tenemos en cuenta que el Cc se encuentra altamente concentrado en el espacio intermembrana de la mitocondria, y que su liberación en el citosol durante la PCD es un evento conservado evolutivamente, resulta factible que el Cc se encuentre regulando muchos otros procesos metabólicos, como se propone en este trabajo.

## 4.2. Papel del Citocromo c en la PCD Vegetal

### 4.2.1. Introducción

El Cc respiratorio es una proteína altamente conservada (Baba *et al.*, 1981), con un papel esencial como transportador electrónico entre los complejos III y IV en la cadena de transporte mitocondrial en condiciones homeostáticas. En condiciones apoptóticas se ha descrito que el Cc es liberado desde la mitocondria en una amplia variedad de organismos: levaduras (Giannattasio *et al.*, 2008), plantas (Balk *et al.*, 1999), moscas (Arama *et al.*, 2006) y mamíferos (Li *et al.*, 1997). Sin embargo, sólo en el caso de mamíferos ha sido posible asignar una función al Cc durante la PCD (Li *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2005).

En el caso de plantas, la PCD está implicada en múltiples procesos esenciales del desarrollo: formación del xilema, formación de la madera en árboles y



plantas perennes, abscisión de las hojas, auto-incompatibilidad y respuesta de defensa frente a patógenos y estreses de origen ambiental.

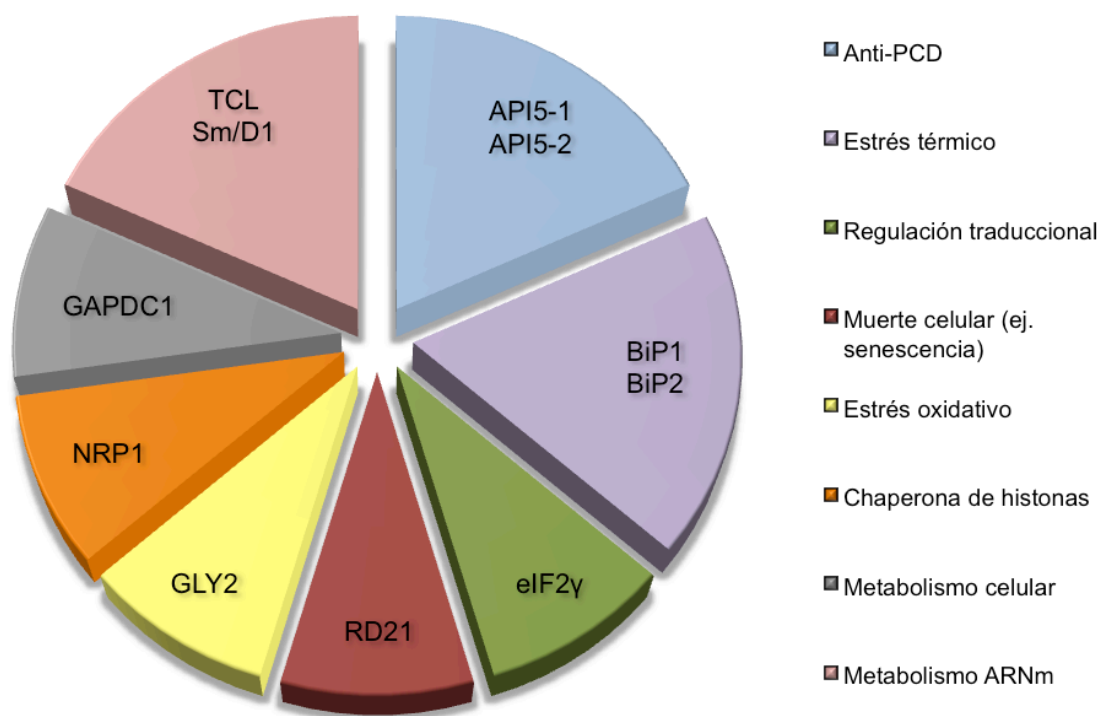
Múltiples investigaciones en el campo de la PCD vegetal han permitido poner de manifiesto una serie de similitudes entre la PCD de animales y de plantas (Vianello *et al.*, 2007) (ver Tabla 3, Introducción).

El posible papel de la mitocondria en la PCD vegetal ha sido propuesto por Jones (2000) y relacionado con la respuesta hipersensible (Lam *et al.*, 2001). La liberación de Cc es la señal más comúnmente usada para identificar a la mitocondria de plantas como un ejecutor de la PCD. La primera evidencia (Zhao *et al.* 1999) está relacionada con la observación de que la adición de Cc a extractos citoplásmicos de zanahoria inducía una degradación del ADN en núcleos purificados de ratón, la cual era prevenida por inhibidores de caspasas. Posteriormente, la liberación de Cc en condiciones de PCD ha sido descrita en múltiples sistemas vegetales (Lam *et al.*, 1999; Stein y Hansen, 1999; Hansen, 2000). Los pasos iniciales de la PCD están acompañados de estrés oxidativo, consumo de ATP, colapso del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de Cc, lo que viene a corroborar la posible implicación del Cc en la PCD de plantas.

Aparte de las funciones canónicas del Cc en células de vertebrados (transporte electrónico y formación del apoptosoma), recientemente han comenzado a aparecer nuevas funciones del Cc, aunque aún inexploradas, (Ruíz-Vela *et al.*, 2002; Boehning *et al.*, 2003; Nur-E-Kamal *et al.*, 2004; Boehning *et al.*, 2005; Szado *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2009; Hüttemann *et al.*, 2011).

#### 4.2.2. Red de Interacciones del Citocromo c durante la PCD Vegetal

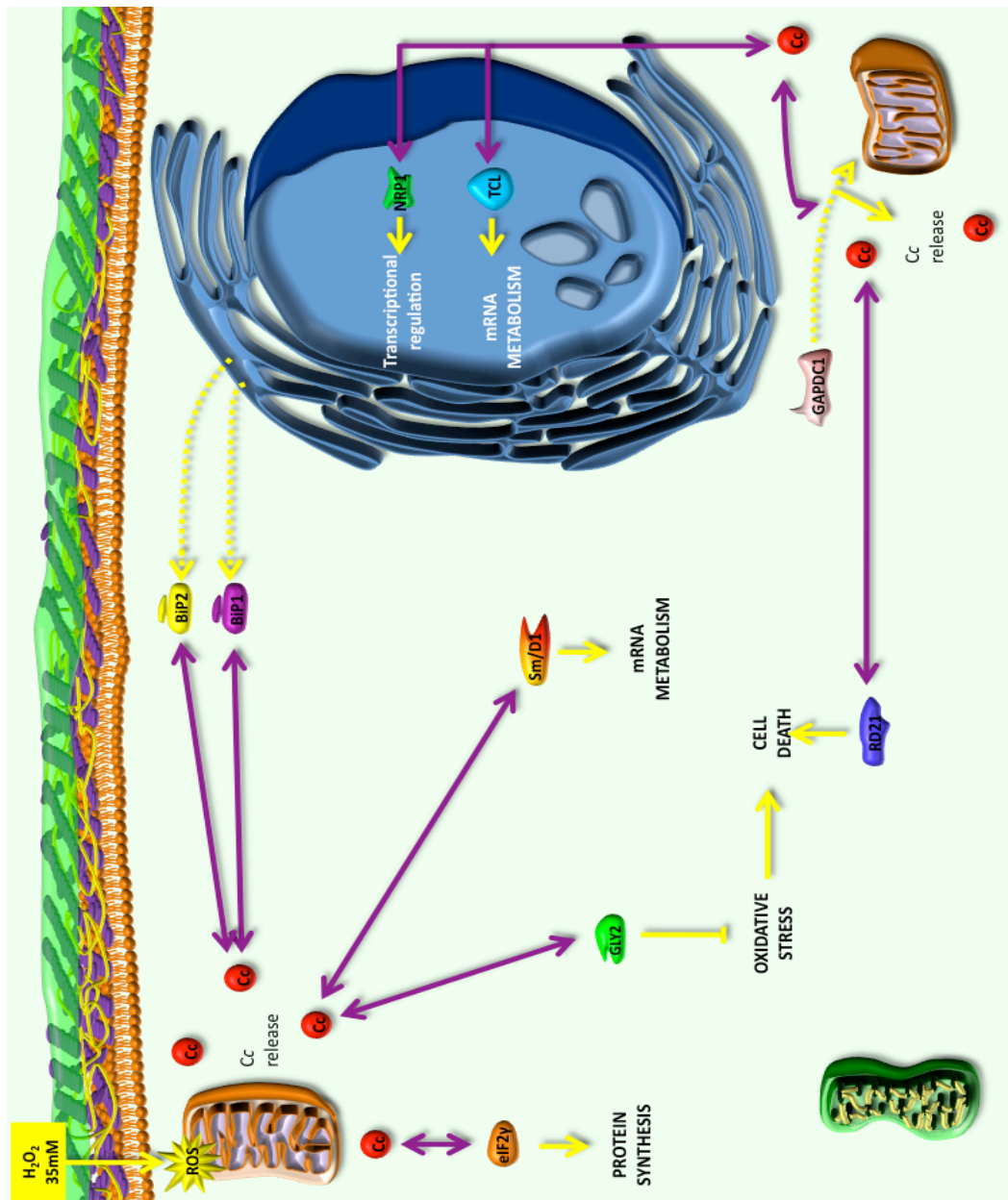
Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el Cc de *A. thaliana* en condiciones de PCD, una vez liberado de la mitocondria, interacciona con al menos 9 dianas, implicadas en diferentes funciones (Figura 94).



**Figura 94. Principales funciones de las nuevas dianas del Cc de *A. thaliana*.** Las dianas del Cc de *A. thaliana* identificadas en este trabajo se pueden clasificar en 8 grandes grupos funcionales.

Estas nuevas dianas del Cc se encuentran relacionadas con diferentes procesos, tales como la síntesis de proteínas (eIF2 $\gamma$ ), el estrés oxidativo (GLY2), la muerte celular (RD21), el metabolismo del ARNm (Sm/D1), regulación transcripcional (NRP1 y TCL), metabolismo energético (GAPDC1) y plegamiento de proteínas (BiP1 y BiP2). La localización de las interacciones entre el Cc y las distintas dianas propuestas en este trabajo se muestra en la Figura 95.





**Figura 95. Esquema de la red de interacciones del Cc en condiciones de PCD en células de *A. thaliana* mostrando la localización de los complejos.** El Cc, en condiciones de PCD, es liberado desde la mitocondria hacia el citosol, donde sirve como regulador clave de una compleja red de interacciones. En el esquema se muestra la localización celular de los complejos, tal y como se deduce de los datos *in vivo* obtenidos por BiFC. Las interacciones establecidas en la bibliografía se representan mediante líneas continuas en amarillo, las translocaciones se muestran con líneas punteadas en amarillo y en líneas continuas en morado se muestran las interacciones establecidas a partir de este trabajo.

#### 4.2.2.1. BiP1 y BiP2

Ambas proteínas, BiP1 y BiP2, son homólogos de HSPA5 de mamíferos (también conocida como BiP o GRP78). En plantas, BiP1 y BiP2 han sido relacionadas con la respuesta frente al estrés en el retículo endoplásmico, siendo capaces de mediar en el aumento en la tolerancia a la sequía y retrasando la senescencia de las hojas inducida por sequía (Valente *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de las proteínas BiP en protoplastos de tabaco (Leborgne-Castel *et al.*, 1999) aumenta la tolerancia celular al estrés del retículo endoplásmico. En el caso de mamíferos, HSPA5 ha sido relacionada con la regulación de la PCD, estando implicada en la inhibición de las caspasas (Reddy *et al.*, 2003) y la regulación de las rutas de supervivencia (Jin *et al.*, 2005; Shkoda *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2007). Más aún, bajo condiciones de estrés del retículo endoplásmico se ha propuesto que HSPA5 es liberada en el citoplasma, promoviendo la supervivencia y proliferación celular (Shkoda *et al.*, 2007).

#### 4.2.2.2. NRP1

Las NRPs (del inglés, *Nucleosome assembly protein 1 (NAP1) - Related Proteins*) constituyen un grupo de proteínas bien conservadas, incluyendo plantas y humanos. El mutante NRP1, en el caso de *A. thaliana* es altamente sensible al estrés genotóxico, mostrando niveles elevados de daño en el ADN, lo que indica que NRP1 resulta esencial para la proliferación celular (Zhu *et al.*, 2006).

Asimismo, NRP1 es un homólogo de la proteína SET humana (Zhu *et al.*, 2006), la cual, como se dijo anteriormente (ver apartado 4.1.2.1.1, Discusión)

se encuentra relacionada con la reparación del ADN tras roturas de cadena simple que se producen durante el estrés oxidativo (Chowdhury *et al.*, 2006), aunque este extremo no ha sido demostrado en el caso de NRP1.

#### 4.2.2.3. eIF2 $\gamma$

El factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2, del inglés *eukaryotic Initiation Factor 2*), altamente conservado a lo largo de la evolución, es un complejo heterotrimérico compuesto por eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$  y eIF2 $\gamma$  (Sugarani *et al.*, 2005). En el caso de vertebrados se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de proteínas causa un aumento en la inducción de la apoptosis mediada por diferentes estímulos (Polunovsky *et al.*, 1994). Este comportamiento ha sido explicado por la inhibición de los mecanismos antiapoptóticos dependientes de la traducción (Fulda *et al.*, 2000). Bajo condiciones apoptóticas en vertebrados se ha demostrado que eIF2 $\alpha$  es fosforilada por PKR, y esta modificación de eIF2 $\alpha$  parece estar relacionada con la inhibición de la traducción durante la apoptosis (Saelens *et al.*, 2001), lo que resulta ser un paso esencial para el inicio de la autofagia (Kouroku *et al.*, 2007), algo que también ha sido puesto de manifiesto en plantas (Langland *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000)

#### 4.2.2.4. RD21

En células de vertebrados la activación de cistein-proteasas representa uno de los pasos más importantes durante la PCD (Jacobson *et al.*, 1997). De forma similar las cistein-proteasas han sido detectadas en células vegetales durante la PCD (Minami y Fukuda, 1995; Solomon *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2005).

RD21 (del inglés, *Responsive to Dehydration 21*) es una cistein-proteasa de la familia de la papaina, que es sintetizada como un precursor inactivo de 57 kDa, el cual madura paulatinamente hacia una forma activa de 33 kDa (Yamada *et al.*, 2001).

RD21 se caracteriza por presentar un sitio activo sensible al estado redox, GxCGSCW, con dos residuos de cisteína capaces de formar un puente disulfuro (Balmer *et al.*, 2003). Recientemente, se ha propuesto que la PDI5 (del inglés, *Protein Disulfide Isomerase 5*) se encarga de la regulación de RD21 al retener a la cistein-proteasa en las vacuolas de almacenamiento de las células endoteliales, bloqueando de este modo su actividad proteasa hasta la activación de la PCD (Farquharson, 2008). Por lo tanto, parece que tanto PDI5 como RD21 podrían estar implicadas en la regulación del avance de la PCD (Ondzighi *et al.*, 2008).

#### 4.2.2.5. GLY2

El sistema glioxalasa, altamente conservado a nivel evolutivo, consta de dos enzimas, glioxalasa I (GLY1) y glioxalasa II (GLY2), implicadas en la detoxificación del metilglioxal, el cual se produce en todos los organismos vivos, aunque tras la exposición a diferentes tipos de estrés abióticos se produce un incremento en sus niveles (Mustafiz *et al.*, 2011).

El metilglioxal es un metabolito dicarbonilo altamente reactivo, formado en el metabolismo de la glucosa, de las proteínas y de los ácidos grasos. Un exceso en la formación de metilglioxal puede causar un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), por lo tanto causando estrés oxidativo (Desai *et al.*, 2010). En células tumorales se

han podido detectar niveles aumentados de GLY2, tanto a nivel de ARNm como de proteína, demostrándose igualmente que inhibidores de GLY2 son capaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales *in vitro* (Chyan *et al.*, 1994; Rulli *et al.*, 2001). Del mismo modo se ha demostrado que el metilglioxal es capaz de inducir apoptosis en diferentes tipos de células de mamíferos (Kang *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2001; Fukunaga *et al.*, 2004).

#### 4.2.2.6. Sm/D1

El espliceosoma, una compleja maquinaria macromolecular formada por varias ribonucleoproteínas nucleares pequeñas ricas en uridina (U snRNPs) y muchos factores no ribonucleoproteicos, es el actor principal del *splicing* (Will y Lührmann, 2001). Hay diferentes complejos U snRNPs, pero todos ellos comparten algunos componentes comunes, concretamente las proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F y G) (Gunnawiek *et al.*, 1997).

Recientemente ha sido posible establecer un nexo entre el *splicing* alternativo y la apoptosis en mamíferos por parte de diferentes grupos, de modo que en condiciones de PCD algunas proteínas sufren un *splicing* distinto al que sufren en condiciones homeostáticas (Schwerk y Schulze-Osthoff, 2005; Moore *et al.*, 2010).

La mutación, delección o eliminación del núcleo del espliceosoma, o de factores de ensamblaje de éste, puede resultar en patrones alterados de *splicing* en levaduras (Clark *et al.*, 2002; Pleiss *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2009; Campion *et al.*, 2010), en mosca (Park *et al.*, 2004) y en células de mamíferos (Massiello *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2006; Hastings *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Baumer *et al.*, 2009). Parece, por lo tanto, que está comenzando a

emerger que, al igual que sucede con los factores reguladores del *splicing*, la concentración relativa o la actividad de factores generales de *splicing* (por ej. Sm/D1, SmB/B') puede determinar la selectividad por uno u otro sitio de *splicing* (Saltzman *et al.*, 2011).

#### 4.2.2.7. TCL

El complejo TREX (transcripción/exporte) tiene un papel conservado en el acoplamiento de la transcripción con el transporte del ARNm en levaduras y metazoos. Este complejo está formado por dos factores de exporte (Yra1/ALY/REF y Sub2/UAP56), asociados al complejo de elongación de la transcripción THO (Sträßer *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2005). En el caso de *A. thaliana*, han podido detectarse a nivel genómico al menos un gen (At5g59950) homólogo de Yra1/ALY/REF y dos genes (At5g11170 y At5g11200), homólogos de Sub2/UAP56 (Furumizu *et al.*, 2010). Por lo tanto, parece que TCL (At5g59950) es un homólogo al factor de exporte Yra1/ALY/REF, por lo que estaría implicado en la regulación de la exportación del ARNm.

#### 4.2.2.8. GAPDC1

La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (EC. 1.2.1.12) es una proteína soluble, que en el caso de mamíferos ha sido relacionada con múltiples funciones, tales como deshidrogenasa glicolítica, inducción de la apoptosis, transporte de ARNt o reparación del ADN (Sawa *et al.*, 1997; Sirover *et al.*, 1997; Laschett *et al.*, 2004). Más allá, estas funciones parecen estar asociadas a las diferentes localizaciones celulares que han sido descritas para esta proteína, estando presentes en el citosol, el núcleo, el retículo endoplásmico, la

mitocondria y asociada con la membrana plasmática (Ryzlak y Pietruszko, 1998; Tisdale *et al.*, 2004).

Recientemente, en el caso de mamíferos, se ha propuesto un papel para la GAPDH en la permeabilización de la membrana mitocondrial durante la apoptosis. En esta nueva función, la GAPDH parece ser translocada a la mitocondria, donde interacciona con VDAC1, provocando la liberación del Cc y AIF, dos factores pro-apoptóticos (Tarze *et al.*, 2007).

#### **4.2.3. Significado Fisiológico de las Interacciones del Citocromo c Durante la PCD Vegetal**

La mayoría de las proteínas identificadas como dianas del Cc parecen desempeñar un papel anti-PCD en las células, tal y como se explicó anteriormente. Por este motivo, resulta plausible que bajo condiciones de PCD, el Cc, una vez liberado desde la mitocondria hacia el citosol, es capaz de establecer interacciones con un amplio número de proteínas de pro-supervivencia, probablemente interfiriendo de algún modo con los mecanismos de pro-supervivencia. Así, la ola de Cc que se propaga a través del citosol parece impedir, de un modo similar a lo que se ha propuesto en el caso de humanos, la coincidencia de señales de pro-supervivencia y señales de PCD al mismo tiempo, garantizando de este modo que la PCD se desarrolla de un modo apropiado.

Asimismo, estos resultados abren una interesante posibilidad, la existencia en otros organismos de un papel conservado del Cc durante la PCD a lo largo de la evolución, tanto en el caso de aquellos organismos que carecen de apoptosoma (por ej. *A. thaliana*, *S. cerevisiae*) como en el de aquellos en los

que el Cc parece no estar implicado en el ensamblaje del apoptosoma (por ej. *D. melanogaster*, *C. elegans*). El hecho que en organismos inferiores se hayan descritos fenómenos de PCD que morfológicamente se asemejan al fenómeno de la apoptosis de vertebrados ha llevado a pensar en la existencia de una maquinaria bioquímica conservada de algún modo a lo largo de la evolución.

La identificación en ambos organismos modelos de dianas conservadas del Cc – BiP1 y BiP2 en plantas y HSPA5 en mamíferos, eIF2 $\gamma$  en plantas y eIF2 $\alpha$  en mamíferos, NRP1 en plantas y SET en mamíferos – parece apoyar nuestra propuesta de la existencia de una red de interacciones implicada en la regulación de la PCD, conservada a lo largo de la evolución, y que tiene al Cc como regulador central.



## 5. CONCLUSIONES

*“Saltar rápidamente a conclusiones rara vez conduce a felices aterrizajes”*

*(S. Sípórín)*



1. Se ha conseguido establecer mediante cromatografía de afinidad y MALDI-TOF/MS la existencia de 24 posibles nuevas dianas del citocromo *c* respiratorio de *Homo Sapiens*.
2. Se han identificado 11 nuevas posibles dianas del citocromo *c* respiratorio de *Arabidopsis thaliana* mediante el uso de cromatografía de afinidad y nanoLC-MS/MS.
3. Mediante complementación bimolecular de la fluorescencia en células embrionarias de riñón (HEK293T) se ha podido confirmar la interacción *in vivo* entre el citocromo *c* de *Homo sapiens* y 13 de las dianas anteriormente identificadas por proteómica.
4. Mediante complementación bimolecular de la fluorescencia llevada a cabo en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* ha sido posible corroborar la interacción del citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* y 9 de las dianas identificadas *in vitro* mediante técnicas proteómicas.
5. Igualmente, se ha podido constatar que la interacción *in vivo* entre el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* y 9 de sus dianas identificadas *in vitro* también se puede analizar *in vivo* mediante complementación bimolecular de la fluorescencia en células HEK293T.

6. Mediante complementación bimolecular de la fluorescencia se ha comprobado que el citocromo c fusionado al fragmento NYFP en células HEK293T presenta una localización mitocondrial en condiciones homeostáticas, pero que bajo condiciones apoptóticas es liberado desde la mitocondria hacia el citosol.
7. Mediante técnicas de DOCKING se ha podido determinar *in silico* la posible estructura de los complejos establecidos entre el citocromo c de *Homo sapiens* y aquellas dianas cuya estructura ha sido resuelta, concretamente ALDOA, ANP32B, PVALB e YWHAE. A partir de estos complejos se ha podido determinar la superficie del citocromo c de *Homo sapiens* usada en la interacción con estas dianas.
8. Se ha podido llevar a cabo el diseño de mutantes del citocromo c en la superficie de interacción determinada a partir de los datos de DOCKING, denominados I81D y Q16D. Ambos mutantes presentan niveles de interacción con las dianas con las que se realizaron los ensayos de DOCKING (ALDOA, ANP32B, PVALB e YWHAE) mayores a los observados en el caso del citocromo c WT, determinados como unidades arbitrarias de fluorescencia mediante complementación bimolecular de la fluorescencia .

9. Se ha demostrado el papel inhibitorio del citocromo *c* de *Homo sapiens* sobre la capacidad de la PVALB para inhibir la apoptosis inducida por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico al tratar las células con tapsigargina. Se ha comprobado que el citocromo *c* WT, así como los mutantes I81D y Q16D, son capaces de inhibir a la PVALB, permitiendo la apoptosis, mientras que los mutantes K27E y K27A, aunque interaccionan con la PVALB, parecen no ser capaces de inhibir a la PVALB, por lo que se bloquea la apoptosis.
10. Igualmente, se ha demostrado el papel inhibitorio del citocromo *c* de *Homo sapiens* sobre la capacidad de NPM para inhibir la apoptosis inducida en respuesta a daños en el ADN al tratar las células con camptotecina. Se ha comprobado como el citocromo *c* WT es capaz de inhibir a NPM, permitiendo la progresión de la apoptosis.
11. Se ha analizado mediante complementación bimolecular de la fluorescencia la capacidad del citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* de interaccionar con las dianas del citocromo *c* de *Homo sapiens* y viceversa, analizando la interacción del citocromo *c* de *Homo sapiens* con las dianas del citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*. De este modo se ha podido comprobar como ambos citocromos *c* son capaces de reemplazarse mutuamente, lo que se puede explicar en base a su elevado nivel de conservación a nivel estructural.

**12.** La identificación en ambos organismos modelos de dianas conservadas del citocromo *c* – BiP1 y BiP2 en plantas y HSPA5 en mamíferos, eIF2 $\gamma$  en plantas y eIF2 $\alpha$  en mamíferos, NRP1 en plantas y SET en mamíferos – parece apoyar nuestra propuesta de la existencia de una red de interacciones implicada en la regulación de la muerte celular programada, conservada a lo largo de la evolución, y que tiene al citocromo *c* como regulador central.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

*“El hombre nada puede aprender sino en virtud  
de lo que sabe”  
(Aristóteles)*





Adams, J.M. (2003). *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*. Genes Dev. **17**, 2481-2495.

Allen, J.W.A., Tomlinson, E.J., Hong, L., Ferguson, S.J. (2002). *The Escherichia coli cytochrome c maturation (Ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome c*. J. Biol. Chem. **277**, 33559-33563.

Arama, E., Bader, M., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H. (2006). *The two Drosophila cytochrome c proteins can function in both respiration and caspase activation*. EMBO J. **25**, 232-243.

Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Kunzler, P., Thöny-Meyer, L. (1998). *Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **251**, 744-747.

Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K. (2003). *Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment*. Dev. Cell. **4**, 587-598.

Arya, R., Mallik, M., Lakhotia, S.C. (2007). *Heat shock genes – integrating cell survival and death*. J. Biosci. **32**, 595-610.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998). *Death receptors: signaling and modulation*. Science **281**, 1305-1308.

Azzi, A., Bill, K., Broger, C. (1982). *Affinity chromatography purification of cytochrome c binding enzymes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 2447-2450.

Baba, M.L., Darga, L.L., Goodman, M., Czelusniak, J. (1981). *Evolution of cytochrome c investigated by the maximum parsimony method*. J. Mol. Evol. **17** 197-213.

Baig, I., Bertini, I., Del Bianco, C., Gupta, Y.K., Lee, Y.M., Luchinat, C., Quattrone, A. (2004). *Paramagnetism-based refinement strategy for the solution structure of human alpha-parvalbumin*. Biochemistry **43**, 5562-5573.

Balk, J., Chew, S.K., Leaver, C.J., McCabe, P.F. (2003). *The intermembrane space of mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death*. Plant J. **34**, 573-583.

Balk, J., Leaver, C.J. (2001). *The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release*. Plant Cell **13**, 1803-1818.

Balk, J., Leaver, C.J., McCabe, P.F. (1999). *Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants*. FEBS Lett. **463**, 151-154.

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., Buchanan, B.B. (2003). *Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 370-375.

Barry, M., Bleackley, R.C. (1998). *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat. Rev. Immunol. **2**, 401-409.

Baumer, D., Lee, S., Nicholson, G., Davies, J., Parkinson, N., Murray, L., Gillingwater, T., Ansorge, O., Davies, K., Talbot, K. (2009). *Alternative splicing*

*events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy.* PLoS Genet. **5**, e1000773. Doi: 10.1371/journal.pgen.1000773.

Bertini, I., Cavallaro, G., Rosato, A. (2006). *Cytochrome c: occurrence and functions.* Chem. Rev. **106**, 90-115.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucl. Acid Res. **7**, 1513-1523.

Boatright, K.M., Salvesen, G.S. (2003). *Mechanisms of caspases activation.* Curr. Opin. Cell Biol. **15**, 725-731.

Boehning, D., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Snyder, S.H. (2005). *A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**, 1466-1471.

Bolduc, N., Brisson, L.F. (2002). *Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation.* FEBS Lett. **532**, 111-114.

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A. (1995). *The role of DNA fragmentation in apoptosis.* Trends Cell Biol. **5**, 21-26.

Bradford, M.M. (1976), *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.* Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Ritcher, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., Henson, P.M. (1997). *Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires*

*calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase.* J. Biol. Chem. **272**, 26159-26165.

Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., Corazza, N. (2003). *Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology.* Semin. Immunol. **15**, 167-176.

Campion, Y., Neel, H., Gostan, T., Soret, J., Bordonne, R. (2010). *Specific splicing defects in S. pombe carrying a dregon allele of the survival of motor neuron gene.* EMBO J **29**, 1817-1829.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G. (2004). *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.* Electrophoresis **25**, 1327-1333.

Chang, L.Y., Yang, W.Y., Browning, K., Roth, D. (1999). *Specific in vitro phosphorylation of plant eIF2 $\alpha$  kinases.* Plant Mol. Biol. **41**, 363-370.

Chang, L.Y., Yang, W.Y., Roth, D. (2000). *Functional complementation by wheat eIF2 $\alpha$  in the yeast GCN2-mediated pathway.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **279**, 468-474.

Chang, T.S., Kim, M.J., Ryoo, K., Park, J., Eom, S.J., Shim, J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Tomita, M., Takahashi, K., Lee, M.J., Choi, E.J. (2003). *p57<sup>KIP2</sup> modulates stress-activated signalling by inhibiting c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/stress-activated protein kinase.* J. Biol. Chem. **278**, 48092-48098.

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J., Mountz, J.D. (1994). *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule*. Science **263**, 1759-1762.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. (1997). *TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis*. J. Biol. Chem. **272**, 32401-32410.

Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.S., Demple, B., Perrino, F.W., Lieberman, J. (2006). *The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death*. Mol. Cell **23**, 133-142.

Chyan, M.K., Elia, A.C., Principato, G.B., Giovannini, E., Rosi, G., Norton, S.J. (1994). *S-fluorenylmethoxycarbonyl glutathione and diesters: inhibition of mammalian glyoxalase II*. Enz. Prot. **48**, 164-173.

Clark, T.A., Sugnet, C.W., Ares, M. Jr. (2002). *Genomewide analysis of mRNA processing in yeast splicing-specific microarrays*. Science **296**, 907-910.

Clarke, P.G.H., Clarke, S. (1996). *Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena*. Anat. Embryol. **193**, 81-99.

Cohen, G.M. (1997). *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem. J. **326**, 1-16.

Cori, S., Adams, J.M. (2002). *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat. Rev. Cancer **2**, 647-656.

Cox, L.S., Hupp, T., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1995). *A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication*. EMBO J. **14**, 2099-2105.

Cryns, V.L., Yuan, J. (1998). *The cutting edge: caspases in apoptosis and disease*. En *When Cells Die*. Editado por Lockshin, R.A., Zackeri, Z., Tilly, J.L. New York: Wiley-Liss Inc; 177-210.

Dalby, A., Dauter, Z., Littlechild, J.A. (1999). *Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications*. Protein Sci. **8**, 291-297.

Datta, P.K., Moses, H.L. (2000). *STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor  $\beta$  signaling*. Mol. Cell. Biol. **20**, 3157-3167.

De Pinto, M.C., Francis, D., De Gara, L. (1999). *The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells*. Protoplasma **209**, 90-97.

De Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., De Gara, L. (2006). *Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death*. Plant J. **48**, 784-795.

Dekkers, J., Bayley, P., Dick, J.R., Schwaller, B., Berchtold, M.W., Greensmith, L. (2004). *Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death*. Neurosc. **123**, 459-466.

Delivani, P., Martin, S.J. (2006). *Mitochondrial membrane remodeling in apoptosis: an inside story*. Cell Death Differ. **13**, 2007-2010.

Demple, B., DeMott, M.S. (2002). *Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions*. *Oncogene* **21**, 8926-8934.

Desai, K.M., Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., Untereiner, A., Wu, L. (2010). *Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy?* *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 273-284.

Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1998). *Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in Arabidopsis suspension cultures*. *Biochem. J.* **330**, 115–120.

Dhar, S.K., St. Clair, D.K. (2009). *Nucleophosmin blocks mitochondrial localization of p53 and apoptosis*. *J. Biol. Chem.* **284**, 16409-16418.

Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., Crespo, J.L. (2008). *The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals*. *Autophagy* **4**, 851-865.

Dorstyn, L., Colussi, P.A., Quinn, L.M., Richardson, H., Kumar, S. (1999). *DRONC, an ecdysone-inducible Drosophila caspase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4307-4312.

Dorstyn, L., Kumar, S. (2008). *A biochemical analysis of the activation of the Drosophila caspase DRONC*. *Cell Death Differ.* **15**, 461-470.

Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y., Kumar, S. (2004). *The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in Drosophila cells*. *J. Cell. Biol.* **167**, 405-410.

Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J.R., Hay, B.A., Kumar, S. (2002). *The role of cytochrome c in caspase activation in Drosophila melanogaster cells*. J. Cell. Biol. **156**, 1089-1098.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000). *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell **102**, 33-42.

Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Ma, X.-Y., Yokoyama, T., Miyata, T., Nakashima, I. (2001). *Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process*. Free Rad. Biol. Med. **31**, 469-478.

Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A.A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K., Nakashima, I. (2000). *Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-Jun N-terminal kinase*. J. Cell. Biochem. **77**, 333-344.

Dukes, A.A., Van Laar, V.S., Cascio, M., Hastings, T.G. (2008). *Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine*. J. Neurochem. **106**, 333-346.

Duursma, A., Agami, R. (2005). *p53-dependent regulation of Cdc6 protein stability controls cellular proliferation*. Mol. Cell. Biol. **25**, 6937-6947.

Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1986) *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell **44**, 817-829.

Elmore, S. (2007). *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol. Pathol. **35**, 495-516.



Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Kayahara, M., Kitagawa, H., Ninomiya, I., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G., Shimizu, K., Miwa, K. (2001). *Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape*. Int. J. Oncol. **18**, 33-39.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata S. (1998). *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature **391**, 43-50.

Ethell, D.W., Buhler, L.A. (2003). *Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain*. J. Clin. Immunol. **23**, 439-446.

Evan, G.I., Vousden, K.H. (2001). *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature **411**, 342-348.

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., Bratton, D.L. (2001). *Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts*. J. Biol. Chem. **276**, 1071-1077.

Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003). *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor*. Cell **112**, 659-672.

Farquharson, K.L. (2008). *A protein disulfide isomerase plays a role in programmed cell death*. Plant Cell **20**, 2006.

Favero, T.G., Abramson, J.J. (1994). *Thapsigargin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum and asolectin vesicles*. Cell Calcium **15**, 183-189.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. (1999). *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage*. Oncogene **18**, 7719-7730.

Fitch, W.M. (1975). *The molecular evolution of cytochrome c in eukaryotes*. J. Mol. Evol. **8**, 13-40.

Forman, H.J., Azzi, A. (1997). *On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology*. FASEB J. **11**, 374-375.

Fukunaga, M., Miyata, S., Liu, B.F., Miyazaki, H., Hirota, Y., Higo, S., Hamada, Y., Ueyama, S., Kasuga, M. (2004). *Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 MAPK in rat Schwann cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **320**, 689-695.

Fulda, S., Meyer, E., Debatin, K-M. (2000). *Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression*. Cancer Res. **60**, 3947-3956.

Furumizu, C., Tsukaya, H., Komeda, Y. (2010). *Characterization of EMU, the Arabidopsis homolog of the yeast THO complex member HPR1*. RNA **16**, 1809-1817.

Gandia, J., Galino, J., Amaral, O.B., Soriano, A., Lluís, C., Franco, R., Ciruela, F. (2008). *Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique*. FEBS Lett. **582**, 2979-2984.

García-Heredia, J.M., Hervás, M., De la Rosa, M.A., Navarro, J.A. (2008). *Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures*. Planta **228**, 89-97.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M. (2005). *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. Cell **123**, 321-334.

Garrido, C., Galluzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006). *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death Differ. **13**, 1423-1433.

Giannattasio, S., Atlante, A., Antonacci, L., Guaragnella, N., Lattanzio, P., Passarella, S., Marra, E. (2008). *Cytochrome c is released from coupled mitochondria of yeast en route to acetic acid-induced programmed cell death and can work as an electron donor and a ROS scavenger*. FEBS Lett. **582**, 1519-1525.

Gilbert, S.F. (2001). *Developmental Biology*, 6<sup>th</sup> ed. (Sunderland, MA: Sinauer Associates).

Glucksmann, A. (1951). *Cell death in normal vertebrate ontogeny*. Biol. Rev. **26**, 5986.

Godoy, L.C., Muñoz-Pinedo, C., Castro, L., Cardaci, S., Schonhoff, C.M., King, M., Tórtora, V., Marín, M., Miao, Q., Jiang, J.F., Kapralov, A., Jemmerson, R., Silkstone, G.G., Patel, J.N., Evans, J.E., Wilson, M.T., Green, D.R., Kagan, V.E., Radi, R., Mannick, J.B. (2009). *Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 2653-2658.

Goldstein, J.C., Muñoz-Piñedo, C., Ricci, J.E., Adams, S.R., Kelekar, A., Schuler, M., Tsien, R.Y., Green, D.R. (2005). *Cytochrome c is released in a single step during apoptosis*. Cell Death Differ. **12**, 453-462.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R. (2000). *The coordinate release of cytochromec during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*. Nat. Cell Biol. **2**, 156-162.

Green, D.R., Kroemer, G. (2004). *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science **305**, 626-629.

Greenberg, J.T. (1996). *Programmed cell death: a way of life for plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 12094-12097.

Greenhalgh, D.G. (1998). *The role of apoptosis in wounding healing*. Int. J. Biochem. Cell Biol. **30**, 1019-1030.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., Pandolfi, P.P. (2006). *Nucleophosmin and cancer*. Nat. Rev. Cancer **6**, 493-505.

Gunnewiek, J.M.K., van de Putte, L.B., van Venrooij, W.J. (1997). *The U1 snRNP complex: an autoantigen in connective tissue diseases. An update*. Clin. Exp. Rheumatol. **15**, 549-560.

- Hacker, G. (2000). *The morphology of apoptosis*. Cell Tissue Res. **301**, 5-17.
- Han, Z., Pantazis, P., Wyche, J.H., Koutabb, N., Kidd, V.J., Hendrickson, E.A. (2001). *A Fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic Jurkat cell line*. J. Biol. Chem. **276**, 38748-38754.
- Hanahan, D. (1983). *Studies on transformation of E. coli with plasmids*. J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985). *Techniques for transformation of E. coli*. En *DNA cloning: a practical approach*. Vol. 1 (Glover, D.M. ed.), pp. 109-135. IRL Press, Oxford, Reino Unido.
- Hansen, G. (2000). *Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells*. Mol. Plant Microbe Interact. **13**, 649-657.
- Hastings, M.L., Allemand, E., Duelli, D.M., Myers, M.P., Krainer, A.R. (2007). *Controls of pre-mRNA splicing by the general splicing factors PUF60 and U2AF65*. PLoS ONE **2**, 3538. Doi: 10.1371/journal.pone.0000538.
- Hengartner, M.O. (1999). *Programmed cell death in the nematode C. elegans*. Recent Prog. Horm. Res. **54**, 213-224.
- Hengartner, M.O. (2000). *The biochemistry of apoptosis*. Nature **407**, 770-776.
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2*. Cell **76**, 665-676.

Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J. (2004). *Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native APAF1 apoptosomes*. EMBO J. **23**, 2134-2145.

Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Glodshtaub, V., Tobar, A., Vidne, B.A. (2003). *Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **284**, H2351-H2359.

Hoeberichts, F.A., Woltering, E.J. (2002). *Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators*. Bioessays **25**, 47-57.

Hörtensteiner, S. (2006). *Chlorophyll degradation during senescence*. Ann. Rev. Plant Biol. **57**, 55-77.

Horvitz, H., Ellis, H., Sternberg, P. (1982). *Programmed cell death in nematode development*. Neurosci. Comment. **1**, 56-65.

Horvitz, H.R. (1999). *Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans**. Cancer Res. **59**, 1701-1706.

Houot, V., Etienne, P., Petitot, A.S., Barbier, S., Blein, J.P., Suty, L. (2001). *Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner*. J. Exp. Bot. **52**, 1721-1730.

Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002). *Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation*. Mol. Cell **9**, 789-798.

- Hu, S., Snipas, S.J., Vicenz, C., Salvesen, G., Dixit, V.M. (1998). *Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease*. J. Biol. Chem. **273**, 29648-29653.
- Huyton, T., Wolberger, C. (2007). *The crystal structure of the tumor suppressor protein pp32 (Anp32a): structural insights into Anp32 family of proteins*. Protein Sci. **16**, 1308-1315.
- Ito, T., Marintchev, A., Wagner, G. (2004). *Solution structure of human initiation factor eIF2 $\alpha$  reveals homology to the elongation factor eEF1B*. Structure **12**, 1693-1704.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. (1997). *Programmed Cell Death in Animal Development*. Cell **88**, 347-354.
- Jang, M., Kang, H.J., Lee, S.Y., Chung, S.J., Kang, S., Chi, S.W., Cho, S., Lee, S.C., Lee, C.K., Park, B.C., Bae, K.H., Park, S.G. (2009). *Glyceraldehyde-3-Phosphate, a glycolytic intermediate, plays a key role in controlling cell fate via inhibition of caspase activity*. Mol. Cell **28**, 559-563.
- Jeng, W.Y., Shiu, J.H., Tsai, Y.H., Chuang, W.J. *Solution structure of reduced recombinant human cytochrome c*. DOI: 10.2210/pdb1j3s/pdb.
- Jiang, B., Zhang, B., Laing, P., Song, J., Deng, H., Tu, Z., Deng, G., Xiao, X. (2010). *Nucleolin/C23 mediates the antiapoptotic effect of heat shock protein 70 during oxidative stress*. FEBS J. **277**, 642-652.
- Jiang, X., Wang, X. (2004). *Cytochrome c-mediated apoptosis*. Annu. Rev. Biochem. **73**, 87-106.

Jimenez, B., Volpert, O.V., Crawford, S.E., Febbraio, M., Silverstein, R.L., Bouck, N. (2000). *Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1*. Nat. Med. **6**, 41-48.

Jin, S., Zhuo, Y., Guo, W., Field, J. (2005). *p21-activated kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association*. J. Biol. Chem. **280**, 24698-24705.

Johnson, N., Ng, T.T., Parkin, J.M. (1997). *Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-Lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis*. Leuk. Res. **21**, 961-972.

Jones, A. (2000). *Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?* Trends Plant Sci. **5**, 225-230.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M. (2001). *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature **410**, 549-554.

Jung, H., Seong, H.A., Manoharan, R., Ha, H. (2010). *Serine-threonine kinase receptor associated protein inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 function through direct interaction*. J. Biol. Chem. **285**, 54-70.

Kang, S., Dong, S., Gu, T.L., Guo, A., Cohen, M.S., Lonial, S., Khoury, H.J., Fabbro, D., Gilliland, D.G., Bergsagel, P.L., Taunton, J., Polakiewicz, R.D., Chen, J. (2007). *FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic*



*transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway. Cancer Cell* **12**, 201-214.

Kang, S.J., Wang, S., Kuida, K., Yuan, J. (2002). *Distinct downstream pathways of caspases-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. Cell Death Differ.* **9**, 1115-1125.

Kang, Y., Edwards, L.G., Thornalley, P.J. (1996). *Effect of methylglyoxal on human leukemia 60 cell growth: modification of DNA, G1 growth arrest and induction of apoptosis. Leuk. Res.* **20**, 397-405.

Kanuka, H., Sawamoto, K., Inohara, N., Matsuno, K., Okano, H., Miura, M. (1999). *Control of cell death pathway by Dapaf-1 a Drosophila APAF1/CED-4 related caspase activator. Mol. Cell* **4**, 757-769.

Karpanen, T., Alitalo, K. (2008). *Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. Annu. Rev. Pathol.* **3**, 367-397.

Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O. (2001). *Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell. Biol.* **11**, 526-534.

Kawai-Yamada, M., Ohori, Y., Uchimiya, H. (2004). *Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. Plant Cell* **16**, 21-32.

Kawashima, T., Pellegrini, M., Chanfreau, G.F. (2009). *Nonsense-mediated mRNA decay mutes the splicing defects of spliceosome component mutations. RNA* **15**, 2236-2247.

Keilin, D. (1925). *On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants*. Proc. R. Soc. London, Ser. B **98**, 312-339.

Kerppola, T.K. (2006). *Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells*. Nat. Protoc. **1**, 1278-1286.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994). *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer **73**, 2013-2016.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics*. Br. J. Cancer **26**, 239-257.

Kho, P.S., Wang, Z., Zhuang, L., Li, Y., Chew, J.L., Ng, H.H., Liu, E.T., Yu, Q. (2004). *p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis*. J. Biol. Chem. **279**, 21183-21192.

King, K.L., Cidlowski, J.A. (1998). *Cell cycle regulation and apoptosis*. Annu. Rev. Physiol. **60**, 601-617.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1995). *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J. **14**, 5579-5588.

Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E. (2001). *Evidence that caspases-13 is not a human but a bovine gene*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **285**, 1150-1154.

König, B.W., Osheroff, N., Wilms, J., Muijsers, A.O., Dekker, H.L., Margoliash, E. (1980). *Mapping of the interaction domain for purified cytochrome c1 on cytochrome c*. FEBS Lett. **111**, 395-398.

Kornbluth, S., White, K. (2005). *Apoptosis in Drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm)*. J. Cell Sci. **118**, 1779-1787.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. (1997). *Caspase-3-generated fragments of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis*. Science **278**, 294-298.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T. (2007). *ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation*. Cell Death Differ. **14**, 230-239.

Kramer, P.H. (2000). *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature **407**, 789-795.

Kroemer, G., Reed, J.C. (2000). *Mitochondrial control of cell death*. Nat. Med. **6**, 513-519.

Kumar, S. (2007). *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ. **14**, 32-43.

Kurosawa, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2003). *Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages*. J. Immunol. **171**, 4672-4679.

Lam, E., Kato, M., Lawton, M. (2001). *Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response*. Nature **411**, 848-853.

Lam, E., Pontier, D., Del Pozo, O. (1999). *Die and let live – programmed cell death in plants*. Curr. Opin. Plant Biol. **2**, 502-507.

Langland, J.O., Langland, L.A., Browning, K.S., Roth, D.A. (1996). *Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR, and inhibition of protein synthesis in vitro*. J. Biol. Chem. **271**, 4539-4544.

Laschett, J.J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M.H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., Pumain, R. (2004). *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition*. J. Neurosci. **24**, 7614-7622.

Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P.W.M., Crofts, A.J., Denecke, J. (1999). *Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress*. Plant Cell **11**, 459-470.

Lee, A.S. (2005). *The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress*. Methods **35**, 373-381.

Lee, S.Y., Park, J.H., Kim, S., Park, E.J., Yun, Y., Kwon, J. (2005). *A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double strand breaks*. Biochem. J. **388**, 7-15.

Lei, M., Tye, B.K. (2001). *Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex*. J. Cell Sci. **114**, 1447-1454.

Levine, B. (2005). *Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense*. Cell **120**, 159-162.

Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., Pardee, A.B. (1995). *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. Science **268**, 429-431.

Li, H.L., Wang, H.H., Liu, S.J., Deng, Y.Q., Zhang, Y.J., Tian, Q., Wang, X.C., Chen, X.Q., Yang, Y., Zhang, J.Y., Wang, Q., Xu, H., Liao, F.F., Wang, J.Z. (2007). *Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing  $\beta$ -catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 3591-3596.

Li, J., Sejas, D.P., Burma, S., Chen, D.J., Pang, Q. (2007). Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. *Carcinogenesis* **28**, 1163-1170.

Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., Williams, R.S. (2000). *Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis*. Cell **12**, 389-399.

Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001). *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature **412**, 95-99.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997). *Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade*. Cell **91**, 479-489.

Lieberman, J., Fan, Z. (2003). *Nuclear war: the granzyme A-bomb*. Curr. Opin. Immunol. **15**, 553-559.

Liu, Q., Hengartner, M.O. (1999). *The molecular mechanism of programmed cell death in C. elegans*. Ann. NY Acad. Sci. **887**, 92-104.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell **86**, 147-157.

Lockshin, R.A. (1969). *Programmed Cell Death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of proteins*. J. Insect Physiol. **15**, 1505-1516.

Lockshin, R.A., Williams, C.M. (1969). *Programmed Cell Death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths*. J. Insect Physiol. **10**, 643-649.

Locksley, R.M., Killen, N., Lenardo, M.J. (2001). *The TNF and TNF receptors superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell **104**, 487-501.

MacKinney, G. (1941). *Absorption of light by chlorophyll solutions*. J. Biol. Chem. **140**, 315-322.

MacMunn, C.A. (1886). *Researches on myohaematin and the histohaematin*. Philos. Trans. R. Soc. London **177**, 267-298.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1978). *A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples*. Anal. Biochem. **87**, 206-210.

Marsden, V.S., O'Connor, L., O'Reilly, L., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P.G., Huang, D.C.S., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K.J., Roy, S., Nicholson, D.W., Vaux, D.L., Bouillet, P., Adams, J.M., Strasser, A. (2002). *Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspases activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspases-9 apoptosome*. Nature **419**, 634-637.

Martínez-Fábregas, J., Rubio, S., Díaz-Quintana, A., Díaz-Moreno, I., De la Rosa, M.A. (2011). *Proteomic tools for the analysis of transient interactions between metalloproteins*. FEBS J. **278**, 1401-1410.

Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J. (2005). *Granzyme A induces caspases-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis*. Immunity. **22**, 355-370.

Massiello, A., Roesser, J.R., Chalfant, C.E. (2006). *SAP155 binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA*. FASEB J. **20**, 1680-1682.

Masuda, S., Das, R., Gheng, H., Hurt, E., Dorman, N., Reed, R. (2005). *Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing*. Genes Dev. **19**, 1512-1517.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000). *Apoptosis in development*. Nature **407**, 769-801.

Mendes, C.S., Arama, E., Brown, S., Scherr, H., Srivastava, M., Bergmann, A., Steller, H., Mollereau, B. (2006). *Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the Drosophila retina*. EMBO Rep. **7**, 933-939.

Mills, K., Daish, T., Harvey, K.F., Pflieger, C.M., Hariharan, I.K., Kumar, S. (2006). *The Drosophila melanogaster APAF1 homologue ARK is required for most, but not all, programmed cell death*. J. Cell. Biol. **172**, 809-815.

Minami, A., Fukuda, H. (1995). *Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase associated with autolysis during differentiation of Zinnia mesophyll cells into tracheary elements*. Plant Cell Physiol. **108**, 489-493.

Mintseris, J., Wiehe, K., Pierce, B., Anderson, R., Chen, R., Janin, J., Weng, Z. (2005). *Protein-protein docking benchmark 2.0: an update*. Proteins **60**, 214-216.

Miyashita, T., Reed, J.C. (1995). *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell **80**, 293-299.

Moore, G.R., Pettigrew, G.W. (1980). *Cytochromes c: evolutionary, structural and physicochemical aspects*. Ed. Springer-Verlag, Berlin.

Moore, M.J., Wang, Q., Kennedy, C.J., Silver, P.A. (2010). *An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis*. Cell **142**, 625-636.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant **15**, 473-497.

Mustafiz, A., Sahoo, K.K., Singla-Pareek, S.L., Sopory, S.K. (2010). *Metabolic engineering of glyoxalase pathway for enhancing stress tolerance in plants*. Methods Mol. Biol. **639**, 95-118.



Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., Horikoshi, M. (2007). *Relationship between the structure of SET/TAF-I beta and its histone chaperone activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 4285-4290.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J. (2000). *Caspase-12 mediated endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amiloid-beta*. Nature **403**, 98-103.

Nemes, Z. Jr., Friis, R.R., Aeschlimann, D., Saurer, S., Paulsson, M., Fesus, L. (1996). *Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue*. Eur. J. Cell. Biol. **70**, 125-133.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J. Immunol. Methods **139**, 271-279.

Nijhawan, D., Honarpour, N., Wang, X. (2000). *Apoptosis in neural development and disease*. Annu. Rev. Neurosci. **23**, 73-87.

Nur-E-Kamal, A., Gross, S.R., Pan, Z., Balklava, Z., Ma, J., Liu, L.F. (2004). *Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis*. J. Biol. Chem. **279**, 24911-24914.

Ondzighi, C.A., Christopher, D.A., Cho, E.J., Chang, S. C., Staehelin, L.A. (2008). *Arabidopsis protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds*. Plant Cell **20**, 2205-2220.

Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J. (2003). *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat. Immunol. **4**, 410-415.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**, 552-565.

Overmeyer, K., Brosche, M., Kangasjarvi, J. (2003). *Reactive oxygen species and hormonal control of cell death*. Trends Plant Sci. **8**, 335-342.

Pacheco, T.R., Moita, L.F., Gomes, A.Q., Hacohen, N., Carmo-Fonseca, M. (2006). *RNA interference knockdown of hU2AF35 impairs cell cycle progression and modulates alternative splicing of Cdc25 transcripts*. Mol. Biol. Cell **17**, 4187-4199.

Palma, P.N., Krippahl, L., Wrampler, J.E., Moura, J.J. (2000). *BiGGER: a new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions*. Proteins **39**, 372-384.

Pan, M.R., Chang, T.M., Chang, H.C., Su, J.L., Wang, H.W., Hung, W.C. (2009). *Sumoylation of PROX1 controls its ability to induce VEGFR3 expression and lymphatic phenotypes in endothelial cells*. J. Cell Sci. **122**, 3358-3364 .

Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000). *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90*. EMBO J. **19**, 4310-4322.

Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A.M., Reenan, R.A., Graveley, B.R. (2004). *Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 15974-15979.

Peter, M.E., Krammer, P.H. (1998). *Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis*. Curr. Opin. Immunol. **10**, 545-551.

Pietenpol, J.A., Stewart, Z.A. (2002). *Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis*. Toxicology, **181**, 475-481.

Pleiss, J., Withworth, G., Bergkessel, M., Guthrie, C. (2007). *Transcript specificity in yeast pro-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components*. PLoS Biol. **5**, e90.doi:10.1371/journal.pbio.0050090.

Polunovsky, V.A., Wendt, C.H., Ingbar, D.H., Peterson, M.S., Bitterman, P.B. (1994). *Induction of endothelial cell apoptosis by TNF- $\alpha$ : modulation by inhibitors of protein synthesis*. Exp. Cell Res. **214**, 584-594.

Qi, S., Pang, Y., Hu, Q., Liu, Q., Li, H., Zhou, Y., He, T., Liang, Q., Liu, Y., Yuan, X., Luo, G., Li, H., Wang, J., Yan, N., Shi, Y. (2010). *Crystal structure of the Caenorhabditis elegans apoptosome reveals an octameric assembly of CED-4*. Cell **141**, 446-457.

Raff, M. (1998). *Cell suicide for beginners*. Nature **396**, 119-122.

Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K. (2005). *Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing*. Int. J. Low. Extrem. Wounds **4**, 138-144.

Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E. (2002). *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78*. FEBS Lett. **514**, 122-128.

Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister P., Austin, R.C., Kaufman, R.J., Lee, A.S. (2003). *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation*. J. Biol. Chem. **278**, 20915-20924.

Reed, J.C. (2006). *Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms*. Nat. Clin. Pract. Oncology **3**, 388-398.

Reed, J.C., Kutbuddin, S.D., Godzik, A. (2004). *The domains of apoptosis: a Genomics Perspective*. Sci. STKE, re9.

Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J.M., Navarro, J.A., Hervás, M., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F.P., De la Rosa, M.A. (2006). *A comparative analysis of the reactivity of plant, horse, and human respiratory cytochrome c towards cytochrome c oxidase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **346**, 1108-1113.

Rodríguez, A., Oliver, H., Zou, H., Chen, P., Wang, X., Abrams, J.M. (1999). *Dark is a Drosophila homologue of APAF1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway*. Nat. Cell Biol. **1**, 272-279.

Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., Karran, E.L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L.M., Fernandez-Luna, J.L., Pinkel, D., Dyer, M.J., Martinez-Climent, J.A. (2005). *Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes*. Blood **106**, 3214-3222.

Rudin, C.M., Thompson, C.B. (1997). *Apoptosis and Disease: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death*. Annu. Rev. Med. **48**, 267-281.

Ruíz-Vela, A., González de Buitrago, G., Martínez-A, C. (2002). *Nuclear Apaf-1 and cytochrome c redistribution following stress-induced apoptosis*. FEBS Lett. **517**, 133-138.

- Rulli, A., Carli, L., Romani, R., Baroni, T., Giovannini, E., Rosi, G., Talesa, V. (2001). *Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues*. Breast Cancer Res. Treat. **66**, 67-72.
- Russel, J.H., Ley, T.J. (2002). *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu. Rev. Immunol. **20**, 323-370.
- Ryzlak, M., Pietruszko, R. (1998). *Heterogeneity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human brain*. Biochim. Biophys. Acta **954**, 309-324.
- Saelens, X., Festjens, N., Vandle Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004). *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. Oncogene **23**, 2861-2874.
- Saelens, X., Kalai, M., Vandenabeele, P. (2001). *Translation inhibition in apoptosis: Caspase-dependent PKR activation and eIF2- $\alpha$  phosphorylation*. J. Biol. Chem. **276**, 41620-41628.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998). *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature **391**, 96-99.
- Saltzman, A.L., Pan, Q., Blencowe, B.J. (2011). *Regulation of alternative splicing by the core spliceosome machinery*. Genes. Dev. **25**, 373-384.
- Salvesen, G.S. (2002). *Caspases and apoptosis*. Essays Biochem. **38**, 9-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>o</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S. (2004). *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu. Rev. Biochem. **73**, 39-85.

Saunders, J.W. Jr. (1966). *Death in embryonic systems*. Science **154**, 604-612.

Savill, J., Fadok, V. (2000). *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature **407**, 784-788.

Sawa, A., Khan, A.A., Hester, L.D., Snyder, S.H. (1997). *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 11669-11674.

Schimmer, A.D. (2004). *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*. Cancer Res. **64**, 7183-7190.

Schwann, T., Schleiden, M. (1847). *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. London: printed for the Sydenham Society.

Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K. (2005). *Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing*. Mol. Cell **19**, 1-13.

Sechi, S., Chait, B.T. (1998). *Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification*. Anal. Chem. **70**, 5150-5158.

Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D.J., Spicer, E.K. (2004). *Identification of nucleolin as an AU-rich element binding proteins involved in bcl-2 mRNA stabilization*. J. Biol. Chem. **279**, 10855-10863.

Seong, H.A., Jung, H., Choi, H.S., Kim, K.T., Ha, H. (2005). *Regulation of transforming growth factor- $\beta$  signaling and PDK1 kinase activity by physical interaction between PDK1 and serine-threonine kinase receptor-associated protein*. J. Biol. Chem. **280**, 42897-42908.

Shani, G., Fischer, W.H., Justice, N.J., Kelber, J.A., Vale, W., Gray, P.C. (2008). *GRP78 and Cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor  $\beta$  signalling and enhance cell growth*. Mol. Cell. Biol. **28**, 666-677.

Shawgo, M.E., Shelton, S.N., Robertson, J.D. (2009). *Caspase-9 activation by the apoptosome is not required for Fas-mediated apoptosis in type II Jurkat cells*. J. Biol. Chem. **284**, 33447-33455.

Sheen, J. (2002). *Signal transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll protoplasts*. Plant Physiol. **127**, 1466-1475.

Shen, S.M., Yu, Y., Wu, Y.L., Cheng, J.K., Wang, L.S., Chen, G.Q. (2010). *Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells*. Carcinogenesis **31**, 419-426.

Shkoda, A., Ruiz, P.A., Daniel, H., Kim, S.C., Rogler, G., Sartor, R.B., Haller, D. (2007). *Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation*. Gastroenterology **132**, 190-207.

Shu, C.W., Sun, F.C., Cho, J.H., Lin, C.C., Liu, P.F., Chen, P.Y., Chang, M.D., Fu, H.W., Lai, Y.K. (2008). *GRP78 and Raf-1 cooperatively confer resistance to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. J. Cell Physiol. **215**, 627-635.

Sirover, M.A. (1997). *Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology*. J. Cell. Biochem. **66**, 133-140.

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. (2001). *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J. Biol. Chem. **276**, 7320-7326.

Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. (2001). *A fresh look tumor immunosurveillance and immunotherapy*. Nat. Immunol. **2**, 293-299.

Solary, E., Giordanetto, F., Kroemer, G. (2008). *Re-examining the role of cytochrome c in cell death*. Nat. Genet. **40**, 379-380.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledone, M., Menachem, E., Levine, A. (1999). *The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants*. Plant Cell **11**, 431-443.

Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U., Green, D.R. (2005). *Connected to Death: The (Unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis*. Science **310**, 66-67.

Srivastava, M., Scherr, H., Lackey, M., Xu, D., Chen, Z., Lu, J., Bergmann, A. (2007). *ARK, the APAF1 related killer in Drosophila, requires diverse domains for its apoptotic activity*. Cell Death Differ. **14**, 92-102.

Stein, J.C., Hansen, G. (1999). *Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells*. Plant Physiol. **121**, 71-79.



Sträßer, K., Masuda, S., Manson, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., Hurt, E. (2002). *TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export*. Nature **417**, 304–308.

Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986). *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J. Mol. Biol. **189**, 113-130.

Subramanian, R.R., Zhang, H., Wang, H., Ichijo, H., Miyashita, T., Fum H. (2004). *Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins*. Exp. Cell Res. **294**, 581-591.

Suen, D.F., Norris, K.L., Youle, R.J. (2008). *Mitochondrial dynamics and apoptosis*. Genes Dev. **22**, 1577-1590.

Sugarani, R.N.V.S., Kamidla, R., Ehtesham, N.Z., Ramaiah, K.V.A. (2006). *Interaction of recombinant human eIF2 subunits with eIF2B and eIF2 $\alpha$  kinases*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **338**, 1766-1772.

Sugiyama, M., Itom J., Aoyagi, S., Fukuda, H. (2000). *Endonucleases*. Plant Mol. Biol. **44**, 387-397.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R.K. (2001). *Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and – independent pathways*. Oncogene **20**, 2122-2133.

Sun, W., Kimura, H., Hattori, N., Tanaka, S., Matsuyama, S., Shiota, K. (2006). *Proliferation related acidic leucine-rich protein PAL31 functions as a caspase-3 inhibitor*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **342**, 817-823.

Supekova, L., Pezacki, J.P., Su, A.I., Loweth, C.J., Riedl, R., Geierstanger, B., Schultz, P.G., Wemmer, D.E. (2002). *Genomic effects of polyamide/DNA interactions on mRNA expression*. Chem. Biol. **9**, 821-827.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Constantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., Kroemer, G. (2000). *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis*. J. Exp. Med. **192**, 571-580.

Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Mailier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., Brenner, C. (2007). *GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization*. Oncogene **26**, 2606-2620.

Tata, J.R. (1966). *Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture*. Dev. Biol. **13**, 77-94.

Thompson, C.B. (1995). *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science **267**, 1456-1462.

Tisdale, E.J., Kelly, C., Artalejo, C.R. (2004). *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity*. J. Biol. Chem. **279**, 54046-54042.

Tombal, B., Denmeade, S.R., Gillis, J.M., Isaacs, J.T. (2002). *A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis*. Cell Death Differ. **9**, 561-573.

- Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2002). *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat. Rev. Immunol. **2**, 735-747.
- Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V. (2006). *14-3-3 proteins as potential oncogenes*. Semin. Cancer Biol. **16**, 203-213.
- Ubbink, M., Bendall, D.S. (1997). *Complex of plastocyanin and cytochrome c characterized by NMR chemical shift analysis*. Biochemistry **36**, 6326-6335.
- Ueda, N., Shah, S.V. (2000). *Tubular cell damage in acute renal failure-apoptosis, necrosis, or both*. Nephrol. Dial. Transplant. **15**, 318-323.
- Valente, M.A., Faria, J., Soares-Ramos, J., Reis, P., Pinheiro, G., Piovesan, N., Morais, A., Menezes, C., Cano, M., Fietto, L., Loureiro, M., Aragao, F., Fontes, E. (2009). *The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco*. J. Exp. Bot. **60**, 533-546.
- Van Loo, G., Van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2002). *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity*. Cell Death Differ. **9**, 20-26.
- Vempati, U.D., Diaz, F., Barrientos, A., Narisawa, S., Mian, A.M., Millán, J.L., Boise, L.H., Moraes, C.T. (2007). *Role of cytochrome c in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome c release*. Mol. Cell. Biol. **27**, 1771-1783.

Vianello, A., Zancani, M., Peresson, C., Petrusa, E., Casolo, V., Krajnáková, J., Patui, S., Bradoit, E., Macrì, F. (2007). *Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death*. *Physiologia Plantarum* **129**, 242-252.

Vogt, C. (1842). *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricans)*.

Volkov, A.N., Ferrari, D., Worrall, J.A., Bonvin, A.M., Ubbink, M. (2005). *The orientations of cytochrome c in the highly dynamic complex with cytochrome b<sub>5</sub> visualized by NMR and docking using HADDOCK*. *Protein Sci.* **14**, 799-811.

Walsh, J.G., Martin, S.J. (2009). *Caspases, substrates and sequential activation*. eLS

Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J. (2004). *Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation*. *Plant J.* **40**, 428-438.

Wang, X.W., Harris, C.C. (1997). *p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis*. *J. Cell Physiol.* **173**, 247-255.

Watanabe, N., Lam, E. (2005). *Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are Arginine/Lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast*. *J. Biol. Chem.* **280**, 14691-14699.

Wigle, J.T., Oliver, G. (1999). *Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system*. *Cell* **98**, 769-778.

Will, C.L., Lührmann, R. (2001). *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. Curr. Opin. Cell Biol. **13**, 290-301.

Won, J., Kim, D.Y., La, M., Meadows, G.G., Joe, C.O. (2003). *Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates Bad interaction with Bcl-X(L) during apoptosis*. J. Biol. Chem. **278**, 19347-19351.

Worrall, J.A., Kolczak, U., Canters, G.W., Ubbink, M. (2001). *Interaction of yeast iso-1-cytochrome c with cytochrome c peroxidase investigated by [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ] heteronuclear NMR spectroscopy*. Biochemistry **40**, 7069-7076.

Worrall, J.A., Reinle, W., Bernhardt, R., Ubbink, M. (2003). *Transient protein interactions studied by NMR spectroscopy: the case of cytochrome c and adrenodoxin*. Biochemistry **42**, 7068-7076.

Woth, A., Thrasher, A.J., Gaspar, H.B. (2006). *Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype*. Br. J. Haematol. **133**, 124-140.

Xie, Z., Chen, Z. (2000). *Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells*. Mol. Plant Microbe Interact. **13**, 183-190.

Xu, S.Z. (2010). *PROX1 facilitates transfected CHO cell proliferation through activation of the AKT signaling pathway*. Int. J. Biomed. Sci. **6**, 49-59.

Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2001). *A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing Arabidopsis leaves*. Plant Physiol. **127**, 1626-1634.

Yan, N., Chai, J., Lee, E.S., Gu, L., Liu, Q., He, J., Wu, J.W., Kokel, D., Li, H., Hao, Q., Xue, D., Shi, Y. (2005). *Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Nature **437**, 831-837.

Yan, N., Gu, L., Kokel, D., Chai, J., Li, W., Han, A., Chen, L., Xue, D., Shi, Y. (2004). *Structural, biochemical and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4*. Mol. Cell **15**, 999-1006.

Yan, N., Xu, Y., Shi, Y. (2006). *2:1 stoichiometry of the CED-4-CED-9 complex and the tetrameric CED-4: insights into the regulation of CED-3 activation*. Cell Cycle **5**, 31-34.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. (1997). *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science **275**, 1129-1132.

Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1998). *Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis*. Science **281**, 1355-1357.

Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundstrom, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M. (2006). *Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 17237-17242.

Yao, D.C., Tolan, D.R., Murray, M.F., Harris, D.J., Darras, B.T., Geva, A., Neufeld, E.J. (2004). *Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA* <sup>(Arg303X/Cys338Tyr)</sup>. Blood **103**, 2401-2403.

Yoshimura, T., Matsushima, A., Aki, K. (1979). *Interaction of cytochrome c with the phosphoprotein phosphovitin*. Biochim. Biophys. Acta **581**, 316-324.

Yu, X., Acehan, D., Ménétret, J.F., Booth, C.R., Ludtke, S.J., Riedl, S.J., Shi, Y., Wang, X., Akey, C.W. (2005). *A Structure of the Human Apoptosome at 12.8 Å Resolution Provides Insights into This Cell Death Platform*. Structure **13**, 1725-1735.

Yu, X., Wang, L., Acehan, D., Wang, X., Akey, C.W. (2006). *Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the Drosophila Apaf-1 related killer*. J. Mol. Biol. **355**, 577-589.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993). *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme*. Cell **75**, 641-652.

Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Ludtke, S.J., Wang, X., Akey, C.W. (2010). *Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex*. Structure **18**, 571-583.

Zeiss, C.J. (2003). *The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice*. Vet. Pathol. **40**, 481-495.

Zhang, J., Tsapralis, G., Bowden, G.T. (2008). *Nucleolin stabilizes Bcl-X<sub>L</sub> messenger RNA in response to UVA irradiation*. Cancer Res. **68**, 1046-1054.

Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., He, Y.W. (2005). *The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes*. Cell Res. **15**, 749-769.

Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., Dreyfuss, G. (2008). *SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing*. *Cell* **133**, 585-600.

Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., Zhang, Q., Hua, G., Lu, H., Hou, Q., Liu, H., Fan, Z. (2007). *Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells*. *Cell Death Differ.* **14**, 489-499 (2007).

Zhao, Y., Jiang, Z.F., Sun, J.L., Zhai, Z.H. (1999). *Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells*. *FEBS Lett.* **448**, 197-200.

Zhou, L., Song, Z., Tittle, J., Steller, H. (1999). *HAC-1, a Drosophila homolog of APAF1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis*. *Mol. Cell* **4**, 745-755.

Zhu, Y., Dong, A., Meyer, D., Pichon, O., Renou, J.P., Cao, K., Shen, W.H. (2006). *Arabidopsis NRP1 and NRP2 encode histone chaperones and are required for maintaining postembryonic root growth*. *Plant Cell* **18**, 2879-2892.

Zoli, W., Ulivi, P., Tesei, A., Fabbri, F., Rosetti, M., Maltoni, R., Giunchi, D.C., Ricotti, L., Briigliadori, G., Vannini, F., Amadori, D. (2005). *Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res.* **7**, R681-R689.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997). *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome – dependent activation of caspase-3*. *Cell* **90**, 405-413.



Zou, H., Li, Y., Wang, X. (1999). *An APAF1-Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J. Biol. Chem. **274**, 11549-11556.

Zuo, S., Xue, Y., Tang, S., Yao, J., Yang, P., Chen, X. (2010). *14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF- $\alpha$ -induced time course-dependent NF- $\kappa$ B activity*. J. Proteome Res. **9**, 3465-3478.



## AGRADECIMIENTOS

*“Escribid las injurias en la arena, grabad los  
beneficios en el mármol”.*

*Claude Boiste*



A priori me pareció lógico pensar que los agradecimientos saldrían solos en cuanto terminará de escribir toda la tesis, que, sin duda, sería la parte más fácil de escribir de todas. Por lo tanto, que mejor que dejarla para el final...

Ahora, que los experimentos están terminados, la tesis escrita, los artículos resultado de este trabajo en ese arduo y, a veces, desesperante proceso de ser publicados y he comenzado con todo la parafernalia previa a la lectura de la tesis (pago de la tutela académica, depósito de la tesis, aceptación del tribunal y un parece infinito etcétera), ahora... me siento delante de una página en blanco en la que en mayúsculas, negrita, Arial, tamaño 18 tan sólo aparece AGRADECIMIENTOS.

Ahora sentado delante de este folio me doy cuenta de que lógicamente lo que he hecho, probablemente sabiéndolo aunque sin querer ser consciente de ello, ha sido dejar para el final la parte que me parece más difícil de escribir.

Cuatro años después de comenzar esta aventura de realizar una tesis (a veces desventura, en ocasiones travesía por el desierto...) son muchos los sentimientos, en ocasiones contradictorios. Por un lado, la inconfesable felicidad por terminar con este interminable trabajo que es realizar una tesis (y escribirla...), pero por otro lado la tristeza por una fase que se termina (¿y ahora que?).

Aunque creo que no es momento de ponernos melancólicos, así que será mejor continuar con los agradecimientos, que o sino comienzo a divagar y no termino, dejaré el best-seller para otro día (ya lo se Ni, soy muy enrevesado...).

En primer lugar a mi familia, a mis padres, a mi hermana y a mi señora esposa por su apoyo, por estar ahí en los momentos malos,... también en los momentos buenos. Sin vuestro apoyo, sin vuestra paciencia (no, este finde también trabajo; no este agosto no, que no tengo vacaciones), esto no hubiera sido posible. Espero poder recompensaros de alguna manera esta larga espera... (espero que no queráis dinero ni piedras para la Pandora, que los becarios andamos "pelaos"...).

Como no, también agradezco a mis directores de tesis, Miguel Ángel de la Rosa y José Antonio Navarro, el haberme permitido realizar la tesis en su grupo de investigación (a estas alturas también mío), el haber confiado en mí a la hora de proponer experimentos y el haberme permitido aventurarme en campos nuevos.

También quiero darle las gracias a otros miembros de mi grupo, que oficialmente no son directores de mi tesis (Manuel Hervás, Irene Díaz y Antonio Díaz), pero que han estado ahí para apoyarme, para escucharme, para echarme un cable en algún experimento, para discutir con ellos algún artículo, para ayudarme a escribir un curriculum y una carta de recomendación (a ver si engaño a algún guiri que me contrate).

Obviamente no me olvido de vosotr@s, mis colegas del labo 1-5. El trabajo en el labo hubiera sido mucho más duro sin los desayunos con vosotros, la coca-cola de la merienda, el almuerzo a la fresquita en el parquecito en agosto, la Formula 1 (ese Hamilton criminal...), las conversaciones frikis,.... (se os echará de menos....). Espero que os vaya bien... ánimo que aunque a veces parezca que no, se termina.

Pero también me acuerdo de los anteriores miembros del labo, los que hace ya tiempo pasaron a mejor vida: Vic, Fran, Franchu, Cris, Orne, Estrellita, los que me ensaaron lo que era trabajar en el labo, a tener las cosas más o menos ordenadas y a que el labo es un régimen comunista en el que no existe la propiedad privada.

*“Venga cuñao que ya queda poco”*

*Tobí*







